

최 종 보 고 서

<p>(뒷면)</p> <div data-bbox="181 1406 392 1518" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;"><p>주 의 (편집순서 8)</p></div> <p>(15 포인트 고딕체열)</p> <p style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</p>	<p>1 1 0 0 1 4 3</p> <p>꿀 벌 질 병 총 합 진 단 시 스 템 의 개 발</p> <p>농 림 축 산 식 품 부</p> <p>↑ 3cm ↓</p>	<p>(앞면)</p> <div data-bbox="612 492 877 577" style="border: 1px solid black; padding: 2px; margin-bottom: 20px;"><p style="text-align: center;">발간등록번호</p><p style="text-align: center;">11-1543000-000147-01</p></div> <p style="text-align: center;">꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발 (Development of total diagnosis system for the diseases in honeybee)</p> <p style="text-align: center; margin-top: 100px;">경 기 대 학 교</p> <p style="text-align: center; margin-top: 50px;">농 립 축 산 식 품 부</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p>
--	---	---

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발” 과제(세부과제 “꿀벌 병원체 종합시스템의 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 07 월 31 일

주관연구기관명 : 경기대학교

주관연구책임자 : 윤 병 수

세부연구책임자 : 윤 병 수

연 구 원 : 이 중 구

연 구 원 : 이 순 복

연 구 원 : 나 하 나

협동연구기관명 : 제주대학교

협동연구책임자 : 손 원 근

협동연구기관명 : 한국양봉협회

협동연구책임자 : 전 정 우

요 약 문

I. 제 목

꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는 꿀벌 병원체에 대한 종합 검출 및 제어 시스템을 확립하고자 수행된 것이며, 이는 그 초기 진단법에서 질병 제어를 위한 표준 처치법까지 포괄하는 것이다.

이 목적을 위하여, 꿀벌의 각종 질병의 병원체들에 대한 각종 검출법들을 다양하게 신규 개발 하였으며, 동시에 기존 개발된 검출법들은 재평가하고, 개선개발 하였으며, 아울러 다량의 검체에 대한 신속한 진단을 위하여, 다양한 꿀벌 질병들의 병원체들에 대한 분자적 검출법의 표준 실험법을 확립하였다. 또한 꿀벌질병의 제어를 위하여, 각 꿀벌 병원체에 대한 표준 처리법을 제안하였다.

2. 연구의 필요성

벌꿀은 우리뿐 아니라 전 세계적으로, 매우 중요하고, 특별하며, 또한 전통적인 식품이다. 최근에 이르러, 전세계의 양봉 또는 양봉산업은 새로이 발생된 질병들에 의하여 큰 타격을 입었으며, 미국과 유럽의 봉군붕괴현상(CCD), 그리고 국내를 강타한 한국산 낭충봉아부패병(kSBV) 등이 그 예이다.

사실, 꿀벌은 많은 작물과 식물들의 가장 중요한 수분매개자이다. 오늘날, 수분매개자로서 꿀벌 그 자체는 이미 벌꿀생산 및 양봉산물들 보다 중요하며, 수분매개를 위한 꿀벌의 수요는, 전반적 봉군은 단계별로 감소되고 있음에도 불구하고, 계속 증가되고 있다. 미국의 전체 봉군의 수는 수년간 계속 삼백만군이하로 감소되어 있으며, 한편 국내 봉군수는 이백만군 수준이다.

더 최근에, 우리는 한 종류의 바이러스가 한 국가의 양봉산업을 붕괴시킬 수 있음을 인식할 수 있었다. 한국형 낭충봉아부패병 바이러스가 그것이며, 이는 불과 3년 이내에 남한의 전체 토봉을 공격하여 거의 괴멸시켰으며, 우리 양봉의 대종을 이루는 서양종 꿀벌들은 이 바이러스에 대한 저항성이 있었다는 것이 큰 행운이었다.

특정 질병을 제어하려면, 그 질병의 원인체를 바르게 진단하고 효과적 치료법을 적용시키는 것이 항상 최선의 길이라 할 것이다. 본 연구의 목표들은 꿀벌질병의 분야에서 바로 이 두 점에 초점을 맞추어 왔다.

III. 연구개발 내용 및 범위

꿀벌의 다양한 감염성 질병 중에서, 2종의 세균, 2종의 진균, 2종의 원생동물 그리고 9종의 바이러스만이 국내에 존재함이 확인되었다.

본 연구는 이들을 질병시료로부터 체계적으로 원인균을 검색할 수 있도록 다양한 검색법을 신규 개발하였다. 먼저, 정확한 실험실적 검사방법으로 병원체 특이유전자 검출을 위한 실시간 PCR법 및 초고속 PCR법을 체계적으로 개발하였으며, 동시에 양봉현장에서 즉석 시험에 편리한 면역학적 검사법(면역 크로마토그래피법)과 등온특이핵산서열 증폭법(LAMP법)을 각 병원체에 특이하게 개발하였다.

본 연구에 의해 신규 개발된 그리고 개선된 검사법에 기반하여, 꿀벌 질병의 체계적 진단이 기본적으로 정립되었으며, 또한 대량의 시료들도 분자 진단을 위한 시스템화된 과정을 거쳐 처리할 수 있도록 하였다. 아울러 진단결과에 따른 표준화된 치료법을 질병제어를 위하여 제안하게 되었다.

IV. 연구개발결과

꿀벌 병원체를 검색할 수 있는 다양한 검출법 개발 결과, 총 10종의 꿀벌병원체에 대한 19종의 검색법을 신규 개발하였다. 이하는 신규개발된 병원체 검색법의 목록이다.

1. 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발
2. 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*에 대한 면역학적 신규검출법의 개발
3. 유럽부저병의 원인균 *Melisococcus plutonius*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발
4. 유럽부저병의 원인균 *Melisococcus plutonius*에 대한 면역학적 신규검출법의 개발
5. Nosema병의 원인균 *Nosema cerana*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발
6. Nosema병의 원인균 *Nosema cerana*에 대한 초고속 PCR 신규검출법의 개발
7. LAMP법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis*의 검출법 개발
8. LAMP법을 이용한 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)의 신속 진단법 개발
9. 초고속 PCR법을 이용한 Black Queen Cell Virus (BQCV) 신속 진단법 개발
10. Black Queen Cell Virus (BQCV)에 대한 면역학적 신규검출법의 개발

11. 초고속 PCR법을 이용한 DWV (Deformed Wing Virus) 신속 진단법 개발
12. 초고속 PCR법을 이용한 SBV (Sacbrood Virus) 신속 진단법 개발
13. LAMP법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발
14. Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 PCR법 개발
15. Sacbrood Virus (SBV)에 대한 면역학적 신규검출법의 개발
16. 초고속 PCR법을 이용한 IAPV (Israel acute paralysis Virus) 신속 진단법 개발
17. RT-LAMP법을 이용한 IAPV (Israel acute paralysis Virus) 신속 진단법 개발
18. IAPV (Israel acute paralysis Virus)에 대한 면역학적 신규검출법의 개발
19. LAMP법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발

한편, 꿀병질병에 대한 병원체의 분자진단을 시스템화하기 위하여, 총 24종의 검색법을 개선 적용하였으며, 이로써 본 검색시스템으로 검색이 가능한 병원체의 수는 총 15종이며, 이들은 국내에서 그 존재가 확인된 꿀벌 병원체들의 모두이다. *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascosphaera apis* (CB; 백묵병), *Aspergillus fulvus* (SB; 석고병), *Nosema apis* (노제마병), *Nosema cerana* ((노제마병), Acute Bee paralysis virus (ABPV; 급성마비병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Kashmir Bee Virus (KBV; 캐시미어 봉증), Kakugo Virus (KV; 미친벌증), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병), korean Sac Brood Virus (kSBV; 한국형 낭충봉아병)가 그것들 이다.

이들 15종 병원체는 모두, 실험실적 검사에서 일반 PCR법으로, 또한 실시간 PCR법이 검색이 가능하나, 현 시점에서 초고속 PCR법으로는 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascosphaera apis* (CB; 백묵병), *Nosema cerana* ((노제마병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병)의 8종만이 검색이 가능하다.

또한 현장 검사의 경우, LAMP법에 의하여 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascosphaera apis* (CB; 백묵병), *Nosema cerana* ((노제마병), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병), Kakugo Virus (KV; 미친벌증)의 8종이 검출될 수 있으며, 면역크로마토그래피에 의한 Rapid kit에 의하여 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병)의 7종을 검색할 수 있다.

꿀벌병원체에 대한 진단은 꿀벌시료(알, 애벌레, 성충, 벌꿀)의 접수에서 시작되며, 분자진단은 시료의 정제 및 준비, 실험실적 분자 검색, 현장검사용 분자검색, 그리고 표준 처방까지 진단과

정의 시스템에 의해 수행된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 성과 중 가장 큰 성과는 꿀벌질병을 체계적으로 진단할 수 있는 분자적 검사법을 기본적 의미에서 확립한 것이라 할 것이다. 이는 과학적 진단결과에 따라 양봉농가가 꿀벌질병에 대한 처치 및 제어를 하는 것이 가능하게 되었다는 것이다. 병원체의 동정 후에 효과적인 약제의 선택 및 처치. 이는 우리 인류가 성취한 성공적 질병제어에서 항상 표준이 된 전략이었다.

본 연구의 연구성과들은, SCI저널에 1편, 국제전문학술지에 12편, 국내등재학회지에 12편 등 총 25편의 학술논문이 출판되었으며, 또한 수많은 논문들이 다양한 국제학회, 국내학회에서 발표되었다.

구체적 산업적 성과물로는, 1) 꿀벌질병 15종의 진단용 PCR kit, 2) 꿀벌질병 15종의 진단용 실시간 PCR kit, 3) 꿀벌 주요질병 8종의 진단용 초고속 PCR kit, 4) 꿀벌 주요질병 8종의 현장진단용 LAMP kit, 5) 꿀벌 주요질병 7종의 현장진단용 Rapid kit (Immunochromatography) 등을 들수 있다. 이중 4) 꿀벌 주요질병 8종의 현장 진단용 LAMP kit,는 (주)GeneClone에서 시제품이 생산되었으며, 5) 꿀벌 주요질병 7종의 현장진단용 Rapid kit는 (주)BioNote에서 시제품이 생산되었다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Development of total diagnosis system for the diseases in honeybee

II. Goal and Importance of the research

1. Goal of the research

This research was carried out to establish the total detection and control system for honeybee-pathogens, including primary diagnosis and standard treatment for disease-control.

For the purpose of these, various methods to detect specific pathogen in each honeybee-disease were newly developed, and/or improved and/or investigated. To rapid diagnosis for the large numbers of specimens, standard protocols of molecular detections for the various etiologicagents in honeybee-diseases were established basically. In addition, to control of honeybee-diseases the standard treatments against each pathogen in honeybee-diseases were also proposed.

2. Importance of the research

Honey is one of important, valuable, and traditional food in Korea and the whole world. Recently, apiculture or bee-industry in the world was greatly damaged by newly developed diseases, such as CCD (Colony Collapse Disorder) in USA and Europe, or kSBV (korean Sac Brood Virus) in Korea, etc.

As a matter of fact, honeybee is most important pollinator among various insects for many crops and plants.

At present honeybee itself as pollinator is more important already than honey or other bee-products in apicultural industry. The demand of honeybee population for the pollination is still increasing, even although total population of honeybee is decreasing step by step, especially well developed lands, such as USA, Europe and Japan. In USA, the number of total populations of honeybee is under 3 millions in several years long, while same number is about 2 millions in South Korea.

More recently, it could recognized that one single type of virus could collapse total honeybee-industry of one nation which is "Korean Sac Brood Virus (kSBV)". Almost of *Apis cerana* in south Korea were attacked by kSBV, and most of them were killed within 3 years. It is only good thing that *Apis mellifera*, major species in Korean bee-industry, is resistant against the invasion of kSBV, while *Apis cerana* is not.

To control specific disease, a correct diagnosis of etiologic agent and application of effective treatment against disease are always best way. The aims of this study were focused on these two points in the field of honeybee diseases.

III. Research Contents and Scope

In variety of infectious diseases in honeybee, only 2 bacterial species, 2 fungi, 2 protozoal species and 9 species of viruses were known as their etiologic agent in Korea. In this study, various detection methods were developed for the purpose of systematic diagnosis from honeybee samples. For the accurate laboratory test, systematic detection system was established based on real-time PCR and Ultra-rapid PCR, while immunological test (immuno-chromatography) and Loop mediated isothermal amplification (LAMP) were also developed for field-test.

Based on these developed and/or improved detection methods, systematic diagnosis in honeybee diseases was basically established. In addition, many numbers of samples could be processed to systematic procedure of molecular diagnosis. And, standard treatments according to results of diagnosis were also proposed to control diseases.

IV. Results and their applications

From the various kinds of developments to detect honeybee-pathogens, total 19 detection methods were newly developed against total 10 different pathogens.

1. New detection method by LAMP for *Paenibacillus larvae* (AFB)
2. New immunological method to detect *Paenibacillus larvae* (AFB)
3. New detection method by LAMP for *Melissococcus plutonius* (EFB)
4. New immunological method to detect *Melissococcus plutonius* (EFB)
5. New detection method by LAMP for *Nosema cerana*
6. New detection method by Ultra-Rapid PCR for *Nosema cerana*
7. Development of new detection method by LAMP for *Ascospaera apis* (CB)
8. Development of new LAMP detection for Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)
9. New Ultra-rapid PCR to detect Black queen cell virus (BQCV)
10. New immunological method to detect Black queen cell virus (BQCV)
11. New detection method by Ultra-Rapid PCR for Deformed Wing Virus (DWV)
12. New Ultra-rapid PCR to detect Sac Brood Virus (SBV)
13. New detection method by LAMP for Sac Brood Virus (SBV)
14. New PCR detection method to distinguish kSBV from SBV
15. New immunological method to detect Sac Brood Virus (SBV)
16. New Ultra-rapid PCR to detect Israeli acute paralysis viruses (IAPV)
17. New detection method by RT-LAMP for Israeli acute paralysis viruses(IAPV)
18. New immunological method to detect Israeli acute paralysis viruses(IAPV)
19. New detection method by RT-LAMP for Kakugo virus (KV)

For the purpose of molecular diagnostic system against honeybee diseases, total 24 detection methods were improved and applied. With newly developed and improved methods, the molecular diagnostic system against honeybee diseases was basically established. By this system, 15 different species of bee-pathogens could be detected. They are all pathogens that still are identified in Korea.

15 species of bee-pathogens are *Paenibacillus larvae* (AFB; American Foul Brood), *Melissococcus plutonius* (EFB; European Foul Brood), *Ascospaera apis* (CB; Chalk Brood), *Aspergillus fulavus* (SB; Stone Brood), *Nosema apis* (Nosema disease), *Nosema cerana* (Nosema disease), Acute Bee paralysis virus (ABPV), Black Queen Cell Virus (BQCV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Deformed Wing virus (DWV), Israel acute paralysis Virus (IAPV), Kashmir Bee Virus (KBV), Kakugo Virus (KV), Sacbrood virus (SBV), and korean Sac Brood Virus (kSBV).

All 15 pathogens could be detected by PCR or Real-Time PCR in laboratory, however, only 8 species could be tested by Ultra-Rapid PCR including *Paenibacillus larvae* (AFB), *Melissococcus plutonius* (EFB), *Ascospaera apis* (CB), *Nosema cerana*, Black Queen Cell

Virus (BQCV), Deformed Wing virus (DWV), Israel acute paralysis Virus (IAPV), Sacbrood virus (SBV).

For the easy field test, 8 major honeybee pathogens could be recognized by LAMP method, such as *Paenibacillus larvae* (AFB), *Melissococcus plutonius* (EFB), *Ascospaera apis* (CB), *Nosema cerana*, Chronic bee paralysis virus (CBPV), Israel acute paralysis Virus (IAPV), Sacbrood virus (SBV), Kakugo Virus (KV) without special equipments such as PCR thermocycler. In addition, *Paenibacillus larvae* (AFB), *Melissococcus plutonius* (EFB), Black Queen Cell Virus (BQCV), Deformed Wing virus (DWV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Israel acute paralysis Virus (IAPV), Sacbrood virus (SBV) could be tested by Immunochromatographic Rapid kit.

Diagnosis against honeybee diseases begin receiving of samples (egg, larvae, adult bee, or honey). Molecular diagnosis is a system of procedures including preparations of sample, molecular detections in laboratory or in field, and even standard treatments.

V. Products of research and their application-plan

Among products of this study, the best seems basically systemic establishment of total molecular detection system against honeybee pathogens. It could be able that bee-keepers could treat and control against bee disease based on scientific diagnosis. Seletion and treatment of effective drugs after recognition of pathogens. It was always standard strategy in successful disease-control that we, human being, achieved.

Real products in this study are 1) Detection PCR kit for 15 honeybee pathogens, 2) Detection Real-Time PCR kit for 15 honeybee pathogens, 3) Ultra-Rapid PCR Detection kit for 8 major honeybee pathogens, 4) LAMP Detection kit in field for 8 major honeybee pathogens, 5) Immunochromatographic Rapid Detection kit in field for 7 major honeybee pathogens. Among these, 4) LAMP Detection kit in field for 8 major honeybee pathogens was produced by GeneClone Inc in Korea as prototype, and 5) Immunochromatographic Rapid Detection kit in field for 7 major honeybee pathogens was also produced by BioNote Inc. in Korea as prototype.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Abstract	2
English Summary	6
Chapter 1. Introduction and summary of the research	20
Chapter 2. The present technical state	21
Chapter 3. Research Contents and Results	23
1. Development of new detection methods for <i>Paenibacillus larvae</i> (AFB)	23
A. New detection method by LAMP for <i>Paenibacillus larvae</i> (AFB)	23
B. New immunological method to detect <i>Paenibacillus larvae</i> (AFB)	27
2. Development of new detection methods for <i>Melissococcus plutonius</i> (EFB)	46
A. New detection method by LAMP for <i>Melissococcus plutonius</i> (EFB)	46
B. New immunological method to detect <i>Melissococcus plutonius</i> (EFB)	49
3. Development of new detection methods for <i>Nosema</i> diseases	62
A. New detection method by LAMP for <i>Nosema cerana</i>	62
B. New detection method by Ultra-Rapid PCR for <i>Nosema cerana</i>	72
4. Development of new detection method by LAMP for <i>Ascospaera apis</i>	76
5. Development of new LAMP detection for Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)	90

6. Development of new detection methods for Black queen cell virus (BQCV)	97
A. New Ultra-rapid PCR to detect Black queen cell virus (BQCV)	97
B. Production of specific antigen from BQCV by recombinant technique in <i>E. coli</i>	100
C. Purification of specific antigen from BQCV by ITC technique	111
7. New detection method by Ultra-Rapid PCR for Deformed Wing Virus (DWV)	115
8. Development of new detection method for Sac Brood Viruses (SBVs)	120
A. New Ultra-rapid PCR to detect Sac Brood Virus (SBV)	120
B. New detection method by LAMP for Sac Brood Virus (SBV)	125
C. New PCR detection method to distinguish kSBV from SBV	135
D. Production of capsid antigen from SBV by recombinant technique in <i>E. coli</i>	144
E. Detection of SBV using by specific monoclonal Antibody	147
9. Development of new detection method for Israeli acute paralysis viruses (IAPV)	151
A. New Ultra-rapid PCR to detect Israeli acute paralysis viruses (IAPV)	151
B. New detection method by RT-LAMP for Israeli acute paralysis viruses(IAPV)	159
C. Phylogenetic analysis of IAPV based on RdRP sequences	165
D. Production of capsid antigen from IAPV by recombinant technique in <i>E. coli</i>	179
10. Development of new detection method for Kakugo virus (KV)	184
A. New identification of Kakugo virus (KV) in Korea	184
B. New detection method by RT-LAMP for Kakugo virus (KV)	187
11. Standard culture methods for various pathogens in honeybee diseases	198
A. Culture methods for <i>Paenibacillus larvae</i> (AFB)	198
B. Culture methods for <i>Melissococcus plutonius</i> (EFB)	200
C. Culture methods for <i>Ascosphaera apis</i> (CB)	202
D. Culture methods for <i>Nosema apis</i>	203
E. Culture methods for Honeybee Virus	204
12. Multi-detection system for the pathogens of honeybee diseases	206
A. Receiving of samples and microscopy	206
B. Molecular detection of bee-pathogens based on specific genes	208

C. Molecular detection of bee-pathogens based on specific antigens	232
13. Standard treatments against honeybee diseases based on molecular diagnosis	235
A. Control of Varroa species	236
B. Control of bacterial disease including AFB and EFB	241
C. Control of nosema disease	243
D. Control of fungal disease including CB and SB	245
E. Control of viral diseases and disinfection methods	247
Chapter 4. Object achievement and related fields of their application	250
Chapter 5. Products of research and their Application-plan	253
A. Summary of products	253
B. Published papers based on this research	254
C. LAMP kits to detect pathogens of honeybee diseases	257
D. Immunological kits (Rapid kits) to detect pathogens of honeybee diseases	271
E. System of molecular diagnosis and standard treatments	277
Chapter 6. Technical Information of foreign countries	278
Chapter 7. Research equipments and facilities	279
Chapter 8. Reference	280

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황	21
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절	미국부저병 검색을 위한 신규 검출법의 개발	23
1.	미국부저병의 원인균 <i>Paenibacillus larvae</i> 에 대한 LAMP 신규검출법의 개발	23
2.	미국부저병의 원인균 <i>Paenibacillus larvae</i> 에 대한 면역학적 신규검출법의 개발	27
제 2 절	유럽부저병 검색을 위한 신규 검출법의 개발	46
1.	유럽부저병 원인균 <i>Melissococcus plutonius</i> 에 대한 LAMP 신규검출법의 개발	46
2.	유럽부저병 원인균 <i>Melissococcus plutonius</i> 에 대한 면역학적 신규검출법의 개발	49
제 3 절	노제마병 검색을 위한 신규 검출법의 개발	62
1.	Nosema병의 원인균 <i>Nosema cerana</i> 에 대한 LAMP 신규검출법의 개발	62
2.	Nosema병의 원인균 <i>Nosema cerana</i> 에 대한 초고속 PCR 신규검출법의 개발	72
제 4 절	백묵병 검색을 위한 LAMP 신규 검출법의 개발	76
1.	LAMP법을 이용한 백묵병 원인균 <i>Ascospheara apis</i> 의 검출법 개발	76
제 5 절	CBPV 검색을 위한 LAMP 신규 검출법의 개발	90
1.	LAMP법을 이용한 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)의 신속 진단법 개발	90
제 6 절	BQCV 검색을 위한 신규 검출법의 개발	97
1.	초고속 PCR법을 이용한 Black Queen Cell Virus (BQCV) 신속 진단법 개발	98

2. 재조합 단백질의 발현을 통한 Black Queen Cell Virus 특이 항원의 생산	100
3. ITC법에 의한 재조합 Black Queen Cell Virus 특이 항원의 정제	111
제 7 절 DWV 검색을 위한 초고속 PCR 검출법의 개발	115
1. 초고속 PCR법을 이용한 DWV (Deformed Wing Virus) 신속 진단법 개발	115
제 8 절 SBV와 kSBV 검색을 위한 신규 검출법의 개발	120
1. 초고속 PCR법을 이용한 SBV (Sacbrood Virus) 신속 진단법 개발	120
2. LAMP법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발	125
3. Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 PCR법 개발	135
4. Sacbrood Virus 특이 항원 재조합 SBV Capsid protein의 발현 및 정제	144
5. 특이 단일클론항체를 이용한 Sacbrood Virus의 검출	147
제 9 절 IAPV 검색을 위한 신규 검출법의 개발	151
1. 초고속 PCR법을 이용한 Israel acute paralysis Virus 신속 진단법 개발	151
2. RT-LAMP법을 이용한 Israel acute paralysis Virus 신속 진단법 개발	159
3. RNA-dependent RNA Polymerase서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰	165
4. Israel acute paralysis virus의 항원을 위한 재조합 Capsid protein의 생산	179
제 10 절 Kakugo virus의 검색과 신규 검출법의 개발	184
1. Kakugo virus의 국내 존재의 규명	184
2. LAMP 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발	187
제 11 절 꿀벌 질병의 원인체에 대한 배양법 확립	198
1. 미국부저병의 원인균인 Paenibacillus larvae의 배양법	198
2. 유럽부저병의 원인균인 Melissococcus plutonious의 배양법	200
3. 백묵병의 원인균인 Ascospaera apis 의 배양법	202
4. 노제마병의 원인균인 Nosema apis 의 배양법	203
5. 꿀벌 바이러스들의 배양법	204
제 12 절 꿀벌 질병시료에 대한 다중 병원체 검사체계	206
1. 시료의 접수 및 광학현미경 검사	206

가. 시료의 접수	206
나. 외형 관찰에 의한 예비 진단.	206
다. 해부 검사에 의한 시료 채취 및 1차 진단	206
라. 광학 현미경 검사	207
2. 특이 유전자에 의한 꿀벌병원체의 검색	208
가. 유전자 검사의 개요 및 종류	208
나. DNA 및 RNA의 순수분리	208
(1). DNA의 순수분리	208
(가) Proteinase K 에 의한 chromosomal DNA 분리	208
(나) Chromosomal DNA 분리와 RNA분리법의 통합.	209
(2). 꿀벌에서 핵산(DNA, RNA)의 순수분리	209
(가) 액체질소 분쇄법 및 DNA시료의 추출	209
(나) Ultra-stirrer 분쇄법 및 DNA시료의 추출	210
(다) RNA Extraction	210
다. Reverse transcriptase reaction	211
라. 일반PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection	211
(1) 일반 PCR에 의한 검사 및 전기영동.	211
마. 정량PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection	213
(1) 개요.	213
(2) 정량 PCR의 조성 및 조건	213
(3) 정량 PCR결과의 판정	213
바. 초고속 PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection	216
(1) 개요.	216
(2) 초고속 PCR의 조성 및 조건	217
(3) 초고속 PCR결과의 판정	217
사. PCR detection용 primer쌍 (일반 PCR용, 정량 및 초고속 PCR용)	218
(1) 미국부저병균 <i>Paenibacillus larvae</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	216
(2) 유럽부저병균 <i>Melissococcus plutonius</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	218
(3) 백목병균 <i>Ascospaera apis</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	218
(4) 석고병균 <i>Aspergillus fulavus</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	219
(5) 노제마병균 <i>Nosema apis</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	219
(6) 노제마병균 <i>Nosema cerana</i> 의 검색을 위한 PCR primer들	219

(7) ABPV 검색을 위한 PCR primer들	220
(8) BQCV 검색을 위한 PCR primer들	220
(9) CBPV 검색을 위한 PCR primer들	220
(10) DWV 검색을 위한 PCR primer들	221
(11) IAPV 검색을 위한 PCR primer들	222
(12) KBV 검색을 위한 PCR primer들	222
(13) KV 검색을 위한 PCR primer들	222
(14) SBV 및 kSBV 검색을 위한 PCR primer들	223
아. LAMP법을 사용하는 꿀벌질병의 detection	223
(1) 개요.	223
(2) 진단용 LAMP의 조성 및 조건	224
(3) LAMP결과의 판정	225
자. LAMP detection용 primer들	225
(1) AFB-검출을 위한 LAMP Primer들의 염기서열	225
(2) EFB-검출을 위한 Primer들의 염기서열	226
(3) Nosema ceranae 검출을 위한 Primer들의 염기서열	226
(4) Ascospaera apis 검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열	227
(5) CBPV검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열	228
(6) SBV 검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열	229
(7) IAPV검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열	230
(8) KV검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열	231
3. 특이 항체에 의한 꿀벌병원체의 검색	232
가. Immunochromatography법에 의한 검사	232
(1) 기본 설명 및 제품의 구성	232
(2) 검사의 순서 및 판정	232
(3) 키트의 원리	233
나. Immunochromatography법에 의해 검사가 가능한 병원체의 종들	234
제 13 절 꿀벌 질병의 진단에 따른 표준 처방	236
1. 꿀벌의 감염성 질병 치료를 위한 꿀벌응애 구축법들	236
가. 개요	236
나. 꿀벌응애의 구축을 위한 친환경 생물학적 처치법	237
(1) 젖산(Lactic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축	237
(2) 개미산(Formic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축	237

(3) 옥살산(Oxalic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축	238
(4) 티몰(Thymol)을 사용한 꿀벌응애의 구축	239
(5) 비넨볼(Bienewohl)을 사용한 꿀벌응애의 구축	239
다. 꿀벌응애의 구축을 위한 약품들	240
2. 미국부저병(afb), 유럽부저병(efb)에 대한 항생제의 처치	241
가. 테트라 사이클린에 의한 세균성 질병의 처치	240
나. 네오테트라에 의한 세균성 질병의 처치	242
다. 소각 처리	243
3. 노제마병에 대한 처치	243
가. Fumagillin(퓨마질린)에 의한 노제마병에 대한 처치	244
나. 그 외의 노제마 제어 약품들	244
4. 백목병(cb), 석고병(sb) 등 병원성 진균에 대한 처치	245
가. 사양관리에 강화에 의한 진균성 질병의 극복	245
나. 그 외의 진균성 질병에 대한 약품들	246
(1) 프로피온산 나트륨	246
(2) 비넨볼(Bienewohl)을 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어	246
(3) 알보픽스(Albifix) 또는 PWO를 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어	246
5. 꿀벌의 병원성 바이러스에 대한 처치	247
가. 사양관리에 강화에 의한 바이러스성 질병의 극복	247
나. 꿀벌응애의 구축에 의한 바이러스성 질병의 극복	247
다. 그 외의 바이러스성 질병에 대한 소독제 들	248
(1) 라이프자켓(Lifejacket-T)에 의한 소독법	248
(2) 락스에 의한 소독법	248
(3) 화염에 의한 소독법	249
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	250
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	253
제 1 절. 연구성과물들의 개요.	253
제 2 절. 본 연구에 의하여 발표된 학술논문들	254
제 3 절. 꿀벌 질병 진단을 위한 LAMP 키트 들	257
제 4 절. 꿀벌 질병 진단을 위한 Immunochromatography 키트들.	271

제 5 절 꿀벌 질병시료에 대한 다중검삭체계 및 표준처방	277
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	278
제 7 장 연구시설·장비 현황	279
제 8 장 참고문헌	280

제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구의 최종 목표는 국내에 그 존재가 확인된 15종의 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단 시스템을 확립하는 것이다. 이는 양봉농민들로부터 질병징후를 보이는 시료를 의뢰받아, 병인체 검사를 근간으로 하는 실험실적 진단을 수행하고, 그 진단결과와 표준처방을 해당 농민에게 바로 통보할 수 있게 하는 것을 요점으로 한다.

본 연구에서 선택된 꿀벌 주요 질병은 전세계적으로 보고된 20여종의 병인체 중 국내발병이 확인된 15종의 병인체 및 질병으로, 이는 세균성 질병이 2종, 진균성 질병 2종, 원생동물성 질병 2종, 바이러스성 질병 9종이다.

상기의 15종 외의 병원체가 국내 존재할 가능성은 매우 크나, 국내에서 확인된 병원체 15종을 모두 나열하면, *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascospaera apis* (CB; 백묵병), *Aspergillus fulavus* (SB; 석고병), *Nosema apis* (노제마병), *Nosema cerana* ((노제마병), Acute Bee paralysis virus (ABPV; 급성마비병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Kashmir Bee Virus (KBV; 캐시미어 봉증), Kakugo Virus (KV; 미친벌증), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병), korean Sac Brood Virus (kSBV; 한국형 낭충봉아병) 들이다.

이들 꿀벌질병에 대한 진단법의 확립을 위하여 본 연구는 병원체를 찾아내는 분자적 진단법을 기본으로 하고자 하였으며, 이를 위하여 15종 꿀벌 주요 질병에 대하여 각 특이 병인체의 신속 검사를 위한 실시간 정량 PCR법, 초고속 PCR법들을 다수 신규 개발하였으며, 기존에 이미 개발된 검사법이 있는 병원체에 대하여는 재평가를 통한 선별 또는 민감도, 특이도를 개선하여 개선 개발을 수행하였고, 아울러, 질병시료의 접수에 의한 실험실적 분자진단법을 완비하고자 하였다.

또한, 현장의 시료에서 비전문가에 의한 과학적 질병진단을 위하여, 특이 항원을 이용하여 생산된 특이 항체로 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트(Lateral flow chromatography)를 개발하였으며, 같은 목적으로 보다 민감한 특이 염기서열을 증폭시키는 방법인 등온핵산증폭법 (Isothermal Loop-mediated Amplification; LAMP)에 근거한 검색법을 다수 신규 개발하였다.

아울러, 질병시료로부터 병인체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 실험실적 일괄 표준 실험법을 PCR법과 실시간 PCR법으로 확립하였으며, 보다 신속한 결과도출을 위한 초고속 PCR법도 주요 질병에 한하여 적용시킬 수 있도록 하였다. 한편 양봉 현장의 신속 진단을 위하여 꿀벌 주요질병에 대한 면역크로마토그래피법 및 LAMP법을 적용할 수 있도록 하였으며, 아울러 진단결과에 따라 유효 약제, 예방 요령 등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하였으며, 진단결과와 함께 표준처방 지침을 통보할 수 있도록 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

벌꿀은 우리뿐 아니라 전 세계적으로, 매우 중요하고, 특별하며, 또한 전통적인 식품이다. 최근에 이르러, 전세계의 양봉 또는 양봉산업은 새로이 발생된 질병들에 의하여 큰 타격을 입었으며, 미국과 유럽의 봉군붕괴현상(CCD), 그리고 국내를 강타한 한국산 낭충봉아부패병(kSBV) 등이 그 예이다.

국내의 경우, 꿀벌질병진단에 대한 산업은 시작단계이며, 본 연구의 결과에 의하여 (주)진클론에서 생산될 LAMP 키트들, (주)바이오노트에 의해 생산될 면역크로마토그래피 키트들이 그 효시가 될 것이다.

지난 수년간 국내의 토봉(*Apis cerana*)은 새로발생된 한국형 낭충봉아병 (korean Sac Brood Virus; kSBV)에 의해 거의 전멸의 위기에 몰렸으나, 2013년 현재, 멸종은 안되겠구나하는 극히 소극적인 안도를 가지고 상기 질병에 대한 저항성 토봉(*Apis cerana*)의 발견을 기대하고 있다. 그러나 봉군 당 5만원 수준에 거래되던 토봉은 수년간 100만원/봉군을 호가하였고, 아직도 봉군당 50만원 이상에서 거래되고 있어, 토종꿀 산업은 전혀 수지를 맞출 수 없으며, 과연 정부의 지원없이 스스로 존속할 수 있을지가 크게 의문시되고 있다. 토종꿀 관련 종사자는 전업 또는 부업농으로 1-2만을 추산하고 있으며, 이들의 생업은 kSBV의 출현과 질병제어 실패로 인해 앞날을 알 수 없게 된 것이다.

한편, 우리 양봉의 대중을 이루는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)이 kSBV에 대하여 저항성이 있었다는 것은 단지 큰 행운이었을 뿐이다. 사실, 서양종 꿀벌에서도 kSBV가 다수 발견되었으나, 발병에 이르게 하지는 아니 하였고, 큰 피해를 입히지 못하였다. 이는 kSBV가 일부 염기서열이 결핍된 변형 바이러스이기에, 이 결핍(deletion)이 그 감수성/저항성의 원인이 아닌가하고 추측되고 있다.

만일, 이 kSBV가 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에도 강한 감수성을 가지고 토봉에 입힌 피해를 그대로 야기시켰다면, 이는 바로 국가적 재앙이 될 수 있었다고 상상된다. 자연계에서 꿀벌은 이미 거의 유일한 수분매개자(pollinator)의 위치에 있으며, 수많은 곡물(Crop)과 자생 식물들이 그 수분을 꿀벌에 의존하고 있다. 꿀벌이 없어진 한반도는 수많은 곡물생산이 중단될 수 있으며, 그 피해는 양봉농민과 벌꿀소비자를 크게 뛰어 넘어, 많은 곡물생산 농민과 곡물소비자에게까지 미치게 될 것이다(국내로 성봉의 수입은 전염병 유입의 이유로 20여년전 금지되어 왔음).

국외의 기술개발현황을 개관하면,

질병진단 전문기업들을 주축으로 한 미국과 유럽의 회사들이 꿀벌질병 진단키트들을 생산하고 있으며, 생산되는 제품들은 거의 현장용 면역크로마토그래피키트들이다. 이 키트들은 부가적인 기구를 필요로 하지 않고, 쉽고 빠르게 검색의 결과를 볼 수 있다는 장점이 있으나, 유전자 검사에 비하여 상대적으로 민감도가 떨어지는 결정적 약점이 있다. 또한 구미의 제품들은 모두 세균, 진균 등을 대상으로 하였으며, 특별한 치료제를 제시할 수 없는 바이러스에 대한 진단키트는 발견되지 않는다.

근래 주목되는 국가는 중국으로, 2012년 아르헨티나에서 개최된 세계양봉대회 (Apimondia)에 미국부저병과 유럽부저병을 검색할 수 있는 현장용 면역크로마토그래피키트들을 선보이는 등 초보적 진단키트의 제품화를 서두르는 듯 보인다.

그 외 러시아 등 동유럽 국가에서도 AFB, EFB, SBV, ABPV 등 4가지 병원체를 검색할 수 있는 현장용 면역크로마토그래피 키트들을 개발하고 시험 중인 것으로 파악되었다.

전반적으로 진단키트의 기술은 거대한 인체 질병 진단키트들이 너무나 큰 몫을 차지하고 있으며, 수의 분야의 진단키트시장은 상대적으로 크게 작은 편이며, 더욱이 꿀벌 질병에 대하여는 어떤 제품도 세계적인 신뢰를 얻지 못하고 있다.

전기한 현장용 면역크로마토그래피 키트들 외에, 특히 유전자 검사를 위한 실험실용 PCR, 실시간 PCR 키트들은 출시된 것을 발견하지 못하였으며, 본 연구에서 시작된 꿀벌질병 진단용 LAMP, 그리고 초고속 PCR들은 세계 최초의 개발이라 할 것이다. 이중 LAMP법은 꿀벌 아닌 다른 질병에서 그 적용이 다수 보고된 바 있었고, 현재 그 적용 범위가 계속 확산 중에 있지만, 꿀벌질병에 대하여 본 연구가 최초라 할 수 있다.

한편, 초고속 PCR은 꿀벌질병의 진단(*Paenibacillus larvae*: AFB, 2008)에서 최초로 그 이름이 알려진 것으로, 여타의 병원균 진단에 그 적용범위가 넓어지고 있지만, 꿀벌질병의 진단에서 초고속 PCR은 계속 이 분야의 연구를 선도하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 미국부저병 검사를 위한 신규 검출법의 개발

1. 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발

가. 서론.

본 연구는 미국부저병(American Foulbrood; AFB)의 원인체인 세균, *Paenibacillus larvae*를 보다 정확히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, *Paenibacillus larvae*만이 보유하고 특이 유전자인 metalloprotease (Mtp) gene을 검출목표물로 하였다. AFB의 검출을 위한 연구는 특이 유전자의 검색, 특이 항원의 검색 등 매우 다양하게 개발되었고, 또한 전 세계적으로 꿀벌의 질병검사에서 가장 많이 사용되고 있기에, 본 연구는 *Paenibacillus larvae*에 대한 최초의 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)법을 적용한 검출법임을 밝히고, 이 내용은 Journal of Apiculture 26(3)에 “Development of a Metalloproteinase gene based loop mediated isothermal amplification assay for detection of *Paenibacillus Larvae*”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) AFB-검출을 위한 Primer들의 염기서열

Table.1. Nucleotide sequences for AFB amplification

	Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	F	AAGGATCCACTCACGGAGCTACAGAACA
	B	ACGTTCGACCGAAGGTCCTTTGTAACGAT
LAMP	F3	ACTCACGGAGCTACAGAACA
	B3	CCGAAGGTCCTTTGTAACGA
	FIP (F1c+HindIII+ F2)	TGCCTTTGATCGCATTGCCGAaagcttTATGAGAACGAAT CCGGAGCA
	BIP (B1c+HindIII+ B2)	CGCCGAATATTCGGAGGATGCaagcttCCGGCTGACCATA AAGTGTT

(2) AFB-검출을 위한 Primer들의 위치 및 증폭과정의 기본 원리

A,

```

          F3                                F2
103 ACTCACGGAGCTACAGAACATACGGCCAATTTGGAATATGAGAACGAATCCGGAGCATTG 162
    3' TGAGTGCCTCGATGTCTTGTATGCC GGTAAACCTTATACTC TTGCTTAGGCCTCGTAAC 162

5' AATGAATCCATTTTCGGATATTATCGGCAATGCGATCAAAGGCAAAGGATGGCTTATTGGA 222
3' TTACTTAGGTAAAGCCTATAATAGCCGTTACGCTAGTTTCCGTTT CCTACCGAATAACCT 222
          F1c

          B1c
5' GAAGACGTGTATACGCCGAATATTCCGGAGGATGCTCTCCGTTCTTAGAGGACCCAACA 282
3' CTTCTGCACATATGCGGCTTATAAGGCCCTCTACGAGAGGCAAGGAATCTCTGGGTTGT 282

5' CTTTATGGTCAGCCGGACCATTACAGCAATCGTTACAAAGGACCTTCGG 331
3' GAAATACCAGTCGGCCTGGTAATGTGCTTAGCAATGTTTCCTGGAAGCC 331
          B2                                B3
    
```

B,

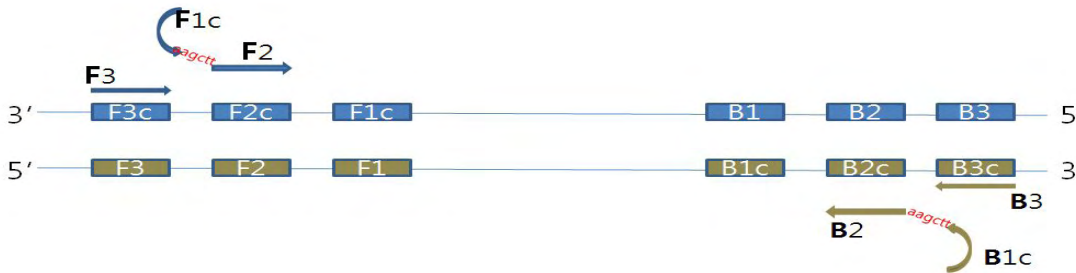
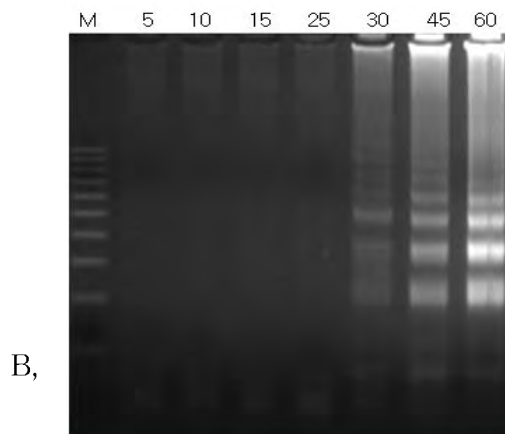
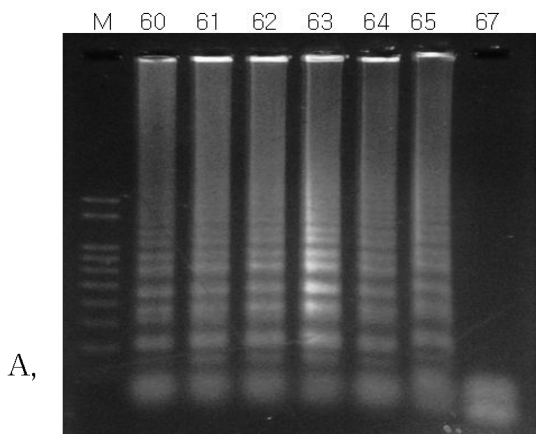


Fig.1. (A) The partial sequence of Mtp gene used to design primers for LAMP. The nucleotide sequences and the positions used to design the primers are represented by dashed lines and labels. (B) A schematic diagram showing the positions at which the primers attach for amplification of the target gene.

다. 결과 및 고찰

(1) AFB-specific LAMP의 최적화



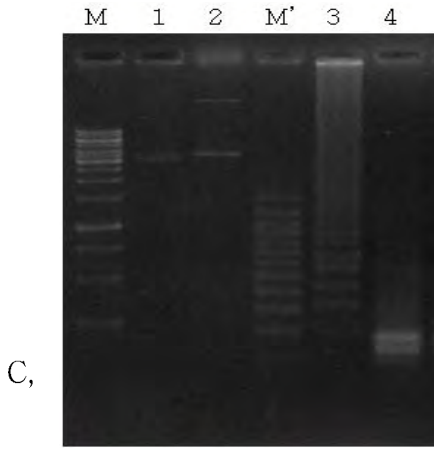


Figure.1. Determination of the optimal temperature, time incubation of LAMP and verification. (A) Determination of the optimal temperature. Lane M: Forever marker; lanes 60-67: LAMP carried out at 60, 61, 62, 63, 64, 65 and 67°C, respectively. (B) Determination of the optimal time. Lane M, 10 kb ladder marker; lanes 5-60, LAMP carried out for 5, 10, 15, 25, 30, 45 and 60 min, respectively. (C) Verified the specificity of primers. Lane M: 1kb ladder marker (Fermentas, Germany); 1, *Hind*III digest of pBX vector (as control); 2, pBX vector no cut; M', forever marker (Seegene, Seoul, Korea); 3, LAMP products from AFB clone; 4, *Hind*III digested of AFB-LAMP products (102, 84 and 54 bp).

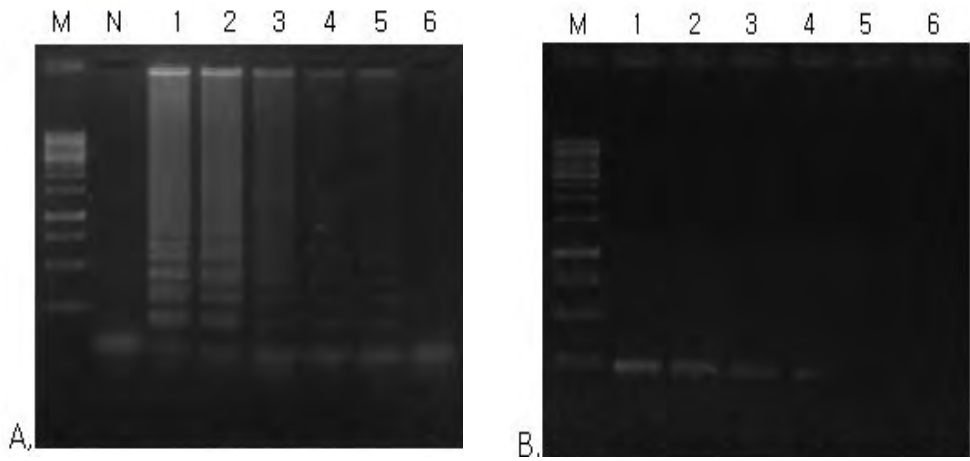


Figure.2. Sensitive detections of AFB-LAMP and conventional PCR. Both LAMP and PCR methods were performed using the 10 fold serial dilutions of the plasmid (pBX-Mtpr-AFB) DNA. Lane 1-6: 6×10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 6 copies, respectively. Lane M, 1 kb ladder marker; lane N, negative control (A) LAMP reaction, (B) PCR reaction.

(2) AFB-specific LAMP의 특이성

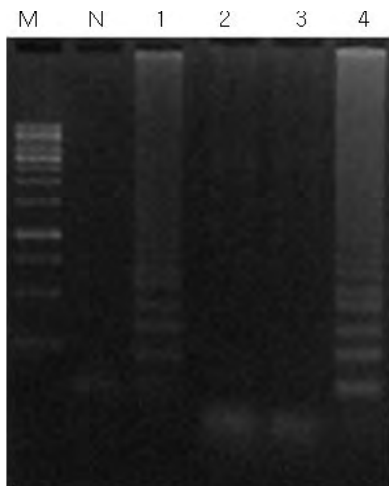


Fig.3. Specific primers for AFB-LAMP assay

Lanes: M, 1kb ladder marker; N negative control; 1, bees genome infection with AFB, EFB and Nosema; 2 bees genome non infected with AFB; 3, bacterial genome mixture without and with P.larvae, respectively.

(3) 현장검사를 위한 AFB-specific LAMP의 시각적 판정법

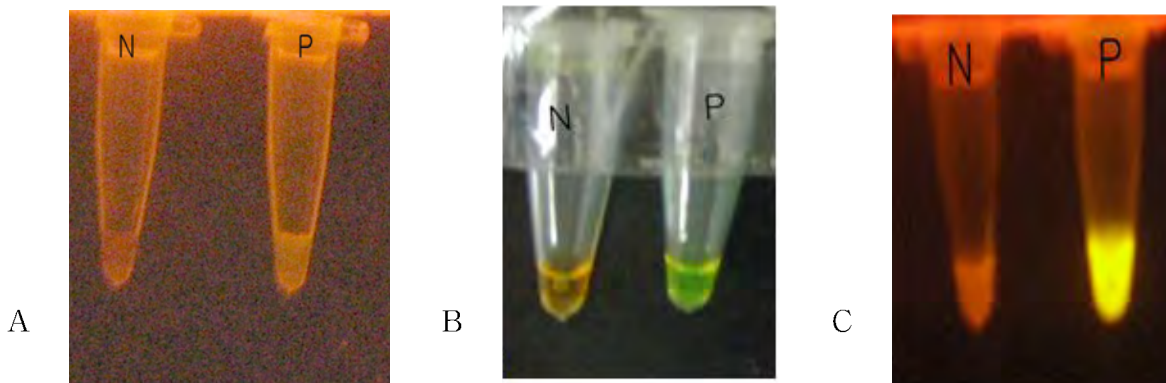


Fig.4. Visual detection of AFB-LAMP products

(A) Inspection of AFB-LAMP by SYBR green (Fermentas, Germany) under UV illumination showing yellow green color transillumination in the positive reaction (AFB-LAMP), negative control (N) with red color (color not change).

(B) Directional inspection by gene finder added to LAMP-products. A positive reaction appeared green and orange in a negative reaction in day light.

(C) Detection of LAMP under UV light with gene finder added. A positive reaction emitted bright green and a negative reaction emitted red fluorescence.

2. 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*에 대한 면역학적 신규검출법의 개발

가. 서론.

미국부저병(American foulbrood, AFB)은 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*에 의한 꿀벌의 세균성 질병으로 가장 많이 발생하는 치명적인 질병이다 (Bailey and Ball, 1991; 양과 윤, 2001). 이 병원체는 꿀벌만을 숙주로 하여 꿀벌의 유충에 침입하고, 내생포자에 의해 전염되며, 감염 후 잠복기간이 길고, 감염속도도 빠르며, 높은 치사율을 보여 양봉산업에 막대한 피해를 주고 있다 (Bamrick, 1964; Atkins 등, 1970). 국내에서도 1950년대 이래 전국적으로 지속적인 발생을 보이고 있다. 감염된 유충은 500만개 이상의 아포를 만들어 2차 전염원이 되며 아포가 내열성 및 내화학적성이 강해 같은 장소에서 매년 연속적으로 발생하기도 한다 (양과 윤, 2001). 미국부저병은 국내 양봉산업에 가장 심각한 피해를 입히고 있어 현재 이 질병은 제2종가축전염병으로 분류, 관리되고 있다 (가축전염병예방법 제2조).

P. larvae subsp. *larvae*는 그람양성 간균 ($2.5\sim 5.0\mu\text{m}\times 0.7\sim 0.8\mu\text{m}$)으로 편모에 의한 운동성이 있고, 대부분의 세균은 4-5개 층으로 둘러싸인 아포를 형성하지만, 이 세균은 7개 층으로 둘러싸여 더욱 강력하다 (Bakhiet 과 Stahly, 1985). 이로 인해 열이나 항생제에 저항성이 강하며, 건조상태에서도 수십 년간 병원성을 보유하며, 35-50년간 생존 한다 (Bakhiet 과 Stahly, 1985).

AFB의 진단은 주로 균을 분리하여 현미경 검경과 생화학적 검사를 통해 이루어지고 있으나, 봉군 내 감염된 애벌레는 일벌에 의해 제거되는 경우가 많으며, 세균의 배양과정에서 미국부저병의 2차 침입세균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *alvei* 등과 복합 감염되어 초기 배양에서 실패하는 경우가 많다. 또한 많은 균주가 잠시 성장 후 자가 용해되는 특성을 가지고 있고, 생화학적 특성이 매우 빈약하여 AFB의 진단이 부정확하고 신속한 진단이 어려운 실정이다 (Sneath 등, 1986).

미국부저병의 발병이후 정확한 처치와 발병이전의 봉군이 원인균인 *P. larvae*에 의해 오염되었는지 여부를 판단하기 위해서는 정확하고 신속한 진단방법은 매우 중요한 도구이다.

최근에는 면역학적 분석방법을 위한 특이항체의 개발이 시도된 바 있다 (백 등, 2002). 또한, *P. larvae*에 대한 polymerase chain reaction (PCR) 검출법이 개발되었으며 (Govan 등, 1998; 양과 윤, 2001), 신속한 진단을 위해 nested PCR (Lauro 등, 2003)과 정량성이 매우 뛰어난 Real-Time PCR (이 등, 2004)이 개발되어 보다 향상된 검색 및 진단법의 개발을 위한 노력이 계속되고 있다.

한편, 대량으로 시료를 빠르게 처리해야 할 경우나 현장에서 별도의 기기 없이 신속한 진단을 위한 ELISA나 Immunochromatographic assay (ICA)의 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 AFB 발생시 또는 발병이전에 방역을 목적으로 오염된 봉군 여부를 판정하기

위해서, *P. larvae* 및 그 아포를 쉽고 빠르게 검색할 수 있는 ELISA와 ICA를 개발하여 현장에서 신속한 진단에 이용하는 것이다. 이를 위하여 *P. larvae*에 특이적인 마우스 단클론항체를 개발하였고, 이를 ELISA와 ICA의 소재로 사용하였으며, ELISA와 ICA를 개발하기 위한 제반 연구를 수행하였다.

나. 항원의 생산.

(1) *P. larvae flagella* 항원

*P. larvae*의 경우는 아래 그림 1과 같이 주로 endospore의 상태로 유충에 감염하여 vegetative cell 상태로 증식되고, 이후, 다시 endospore의 상태로 생존하며 순환적인 감염을 지속하는 속성이 있다. 그림 2의 염색사진과 같이 병증의 경과에 따라 분포정도가 변화하고 있으므로, cell의 상태 및 아포의 상태가 공존하기 때문에 감별을 위한 두 종류의 감염상태를 비교할 필요가 있을 것으로 판단하였다. *P. larvae*는 flagella를 갖는 세균이므로 vegetative cell인 상태에서는 flagella에 대한 특이항원을 정제하여, 또한, *P. larvae*의 아포나 다른 세균의 성분과 차별되는 특이항체를 별도로 개발할 필요가 있다. 이를 위하여 flagella 항원의 정제를 실시하였다.

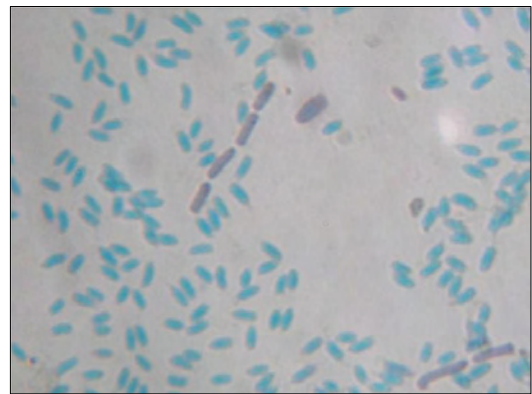
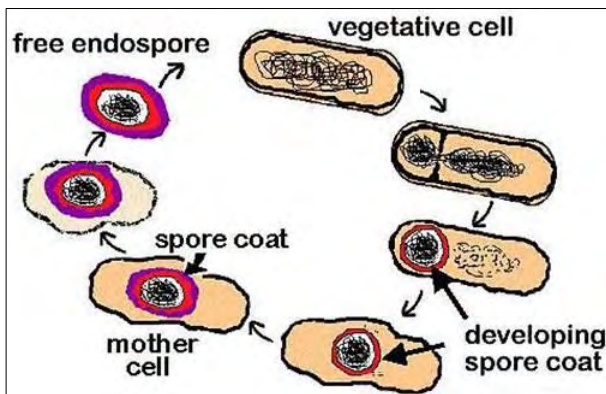


Fig 1. Diagram of endospore formation in *P. larvae*. Fig. 2. *P. larvae* spore (vegetative cells are also observed)

*P. larvae*를 BHI 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 그람염색을 한 결과 그람양성의 간균임을 확인하였다 (Figure 6, A). *P. larvae*의 flagella를 분리하기 위하여 그림 3의 도해와 같이 수행하였다. 즉, BHI agar배지에 배양된 *P. larvae*를 수확하여 물리적으로 flagella를 절단한 후, 원심분리정을 통하여 정제하였다. Flagella의 절단은 원심분리 (5,000 x g, 20min)를 통하여 2회 세척한 균체를 2mm diameter의 glass bead (SiLibeads, Sigmund Lindner, GmbH)를 사용하여 30분간 진탕하여 분리하였다. 이후 원심분리(5,000 x g, 20min)를 통하여 절단된 flagella가 부유된 상층액을 회수하고, 이들 상층액을 모아서 최종적인 원심분리 (14,000 x g, 40min)를 통하여 침전된 flagella 분획을 얻어내었다. 각 단계별 분획들의 항원가를 ELISA를 통하여 분석한 결과는 그림 4에 나타내었다. 최종적으로 얻어진 분획은 높

은 항원가를 보이는 순수한 flagella의 분획으로 판단되었으며 단백질농도는 약 300 μ g이었다(Fig 5). Flagella의 분획은 소분하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 마우스의 면역과 Hybridoma의 screening에 사용하였다.

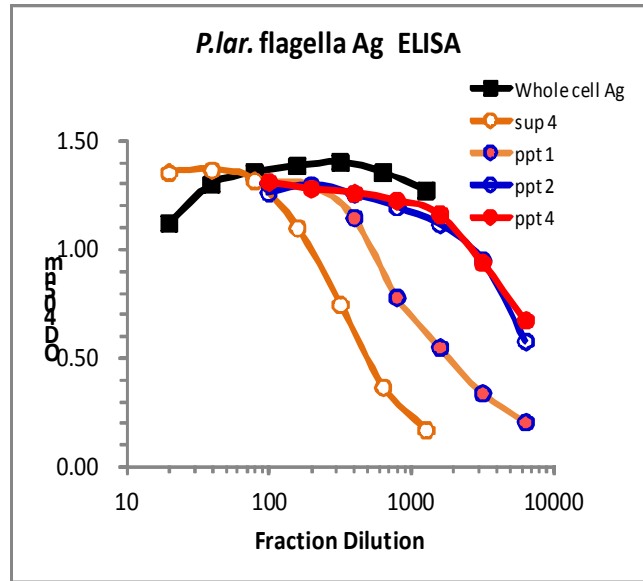
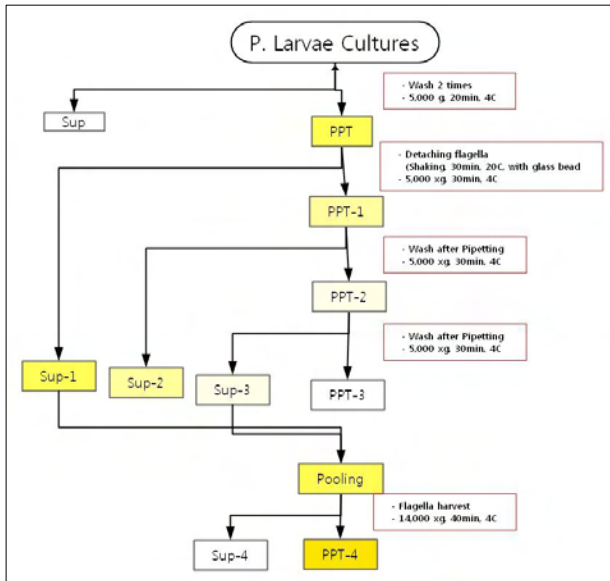


Fig 3. Diagram of purification of *P. larvae* flagella.. Fig 4. ELISA titers of purified fractions resulted from purification of flagella.

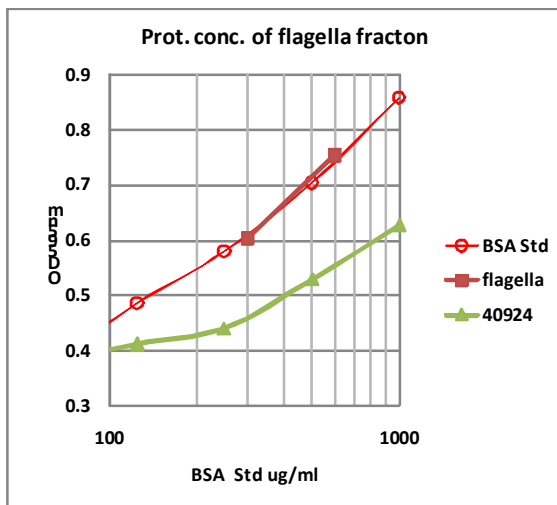


Fig. 5. Protein concentration of purified *P. larvae* flagella fraction.

(2) *P. larvae* 아포항원

P. larvae (ATCC 9545)를 Brain heart infusion (BHI) plate (DIFCO, U.S.A.) 에 도말하여 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 후, 단일집락을 택하여 AK 배지 (Sporulating Agar) 에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하였다. 아포형성 여부를 확인하기 위해 AK 배지에 배양된 균을 24시간 간격으로 슬라이드에 도말하여 자연 건조시킨 후, malachite green (Junsei, Japan) 염색시약을 떨어뜨리고 가열판에서 2~3분간 가운 염색한 다음 냉각시키고 흐르는 수돗물로 세척하였다. 이후

Safranin O (Safranin, 소망제약) 로 30초간 대조염색한 후 세척하고 초록색으로 염색된 아포를 광학현미경상에서 검경하였다. 배양 시간의 경과에 따라, 푸른색의 malachite green 에 염색되는 아포가 safranin O에 의해 염색되는 붉은 색의 영양 세균에 비해 크게 증가되었으나, 여전히 일부 아포화하지 않은 세균체도 관찰되었다 (Figure 6, B-F), 그러므로 아포항원 준비를 위해서는 적어도 5일 이상의 배양이 바람직할 것으로 판단되었다.

배양된 아포는 scraper를 이용하여 plate로부터 긁어 회수하고 생리식염에 부유시킨 후, 3회 원심분리하여 (1,600 x g, 20분) 침전물을 회수하고 소분하여 냉동보관 (-70°C)하면서 BALB/c 마우스의 면역원 혹은 hybridoma clone 선정을 위한 항원으로 사용하였다.

(3) *P. larvae*의 spore의 항원 분리를 위한 배양방법 제안

일반적으로 *P. larvae*의 spore 항원을 얻기 위해서는, *P. larvae*를 Brain heart infusion (BHI) plate 에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 단일집락을 택하여 AK 배지 (Sporulation Agar)에 도말하고 37°C에서 5일간 배양하는 방법을 사용한다. 이후 원심분리에 의한 침전 분획의 회수에 의하여 항원을 마련한다. 그러나 단순히 배양시간만 약 3일간 연장시킨 결과, 아포 수확을 위하여 원심분리 할 때 원심상층에 cream 양의 소수성(hydrophobic)의 분획이 회수되었다. 해당분획은 거의 순수한 아포의 응집괴로서 손쉽게 회수가 가능하였으며, 소수성의 물성을 보였기에 면역원으로서 보다 효과적인 면역반응을 유도할 수 있을 것으로 판단되었다.

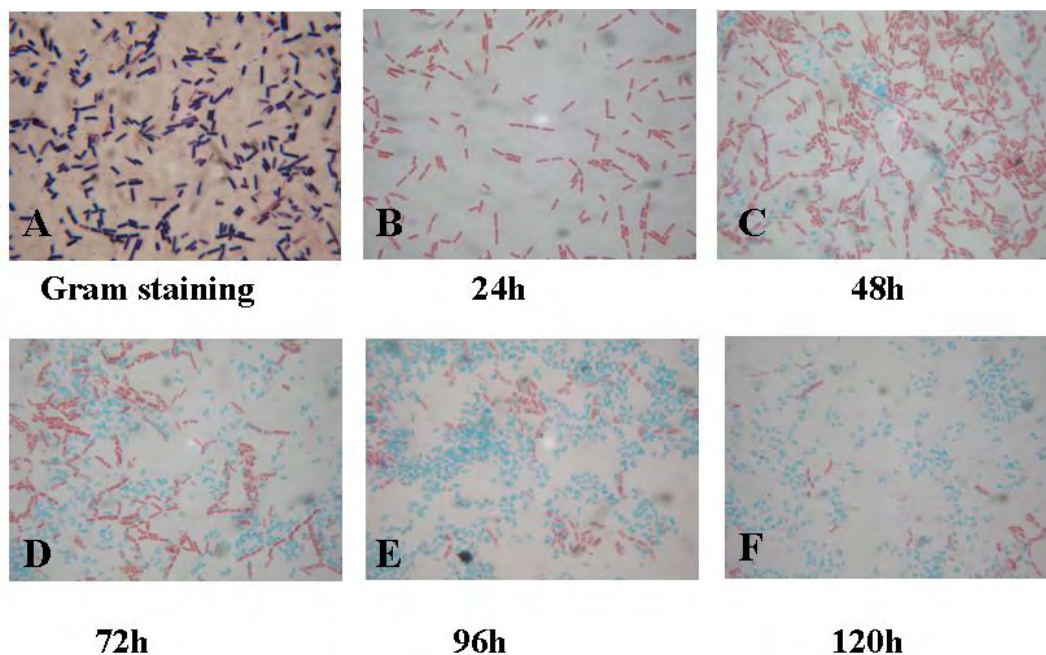


Fig. 6. Gram staining & spore staining of *P. larvae* spore through time elapse.

(A) of *P. larvae* incubation onto Brain Heat Infusion agar at 37°C for 24 h and spore (B to

F) staining of the organism at 24h, 48h, 72h, 96 h and 120 h incubation onto AK agar at 37 °C.

Table 1. Composition of *P. larvae* culture medium per liter

	Component	amount to add per 1 liter
<i>P. larvae</i> medium	Pancreatic digest of gelatin	6.0g
	Pancreatic digest of casein	4.0g
	Yeast extract	3.0g
	Beef extract	1.5g
	Dextrose	1.0g
	Agar	15.0g
	Manganous sulfate	0.3g

다. 단클론항체의 제조

(1) 마우스의 면역

각각 준비한 *P. larvae* flagella 항원 (15µg/50µl PBS) 및 spore 항원 (침전용적 대비 2배 용적의 PBS에 부유) 50µl를 동량의 Complete Freund's Adjuvant (Sigma, U.S.A.)에 유제화하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내 접종하여 면역을 실시하였다. 추가접종은 50µl의 항원액과 Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, U.S.A.)을 동량으로 섞은 유제액을 2주 간격으로 3회 복강내로 접종하였으며, 매 추가접종시 미정맥을 이용한 소량의 채혈을 통하여 항체를 측정하였다. 만족할 만한 역가를 확인 한 후 항원액 만을 24시간 간격으로 50µl씩 3회 복강내로 접종하였다.

정제한 *P. larvae*의 flagella를 면역원으로 사용하여 과면역시킨 결과는 그림 7에 나타내었다. 면역횟수의 증가에 따라, 항체가의 상승이 관찰되었으며, 항체가가 적어도 10⁵ 이상을 보이는 시점에서 SP/2, myeloma와의 fusion을 통하여 특이항체를 분비하는 hybridoma 클론들을 생산하였다. 바람직한 hybridoma의 생산을 위해서는 적어도 10⁵ 이상의 역가를 보이는 시점에서 fusion작업을 실시할 것이 요구되는 것으로 사료된다.

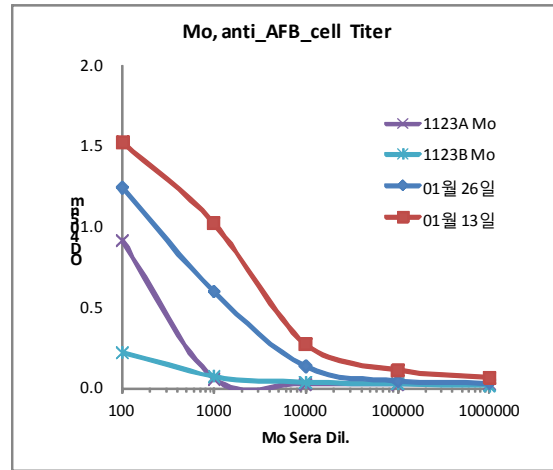


Fig 7. Time point of antibody titers increasing.

(2) 세포융합

최종접종 24시간에 경추탈구로 희생시킨 BALB/c 마우스의 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다. 적출한 비장은 70% ethanol에 침적한 즉시 꺼내어 washing media에 2회 침적하여 세척하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 미리 37°C로 가온하여 준비하였다. 비장세포의 분리를 위하여 50ml tube 위에 멸균된 stainless steel mesh (400목)를 거치한 후 비장을 넣고 3 ml 주사기로 비장 내에 washing medium을 주입시켰다. 외피를 제거하고 washing medium 20 ml를 흘려주며 분리된 비장세포가 tube내로 주입되도록 하였다. 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)로 세척한 비장세포는 세척과 동시에 미리 mid-log phase 상태로 증식시켜 준비한 SP/2 myeloma cell을 50ml tube에 넣고 동시에 원심분리 (1500rpm, 4분, 실온)하여 3회 세척하였다. 원심분리 후 침전된 세포의 packed volume이 비장세포와 동일하게 되도록 세포의 양을 조절하여 비장세포와 SP/2 myeloma cell을 혼합하였다. 이후 3회 더 원심분리(1500rpm, 4분, 실온)를 실시하여 혈청성분을 완전히 제거하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 tube 바닥에 얇게 골고루 퍼지게 한 후, polyethylene glycol 1500 (Roche, GmbH)을 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합이 완료된 세포들은 washing medium으로 3회 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)하여 세척하였다 (정우준, 2003).

세포융합 후 일부를 취하여 핵스트다이(Thermo scientific, USA)로 핵염색을 실시하여 fusion의 상태를 확인하였다 (그림 8). 염색된 핵의 상이한 size를 통하여 myeloma의 대형핵과 spleen cell의 소형핵이 하나의 세포막 내에 존재하는 것이 관찰되었으며, 이러한 핵염색은 통하여 다양한 세포융합의 상태를 확인하는 간단한 방법으로 권장할 만 하였다.

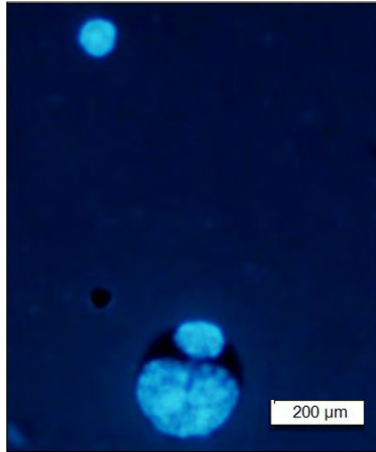


Fig. 8. Nucleus stained by Hoechst 33258.

침전된 세포를 HAT medium 80ml에 부유시켜 96 well tissue culture plate (Nunc, Denmark)에 150 μ l/well 씩 분주하였다. 분주를 한 후 24시간이 경과 후, HAT medium을 5일 동안 추가하여 세포융합이 되지 않은 SP/2 cell을 사멸시키고, 융합된 hybridoma 세포만 선택적으로 배양하였다. 5일후 hybridoma 세포의 관찰이 확인되면, HAT medium을 첨가시켜 주었다. 세포의 증식정도에 따라 배양액 교환주기를 조절하였다.

(3) Hybridoma clone의 선별을 위한 ELISA

특이 항체를 분비하는 hybridoma clone을 선별하기 위하여 세포가 증식하여 well 바닥의 1/3 정도 채워졌을 때, 배양 상층액을 100 μ l씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 항원을 coating buffer로 희석 (10 μ g prot/ml)하고, 96well ELISA plate (Nunc maxisorb, U.S.A.)에 100 μ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 흡착시켰다. 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 3회 세척 후, 비특이적인 항체의 결합을 억제하기 위하여 0.2%의 bovine serum albumin (BSA) blocking 용액 200 μ l를 각 well에 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 건조시켜 냉장보관하면서 hybridoma 선별을 위한 ELISA에 사용하였다.

배양된 hybridoma 세포 상층액을 100 μ l씩 ELISA plate well에 가한 후 실온에서 40분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-horse radish peroxydase (HRP) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 conjugate buffer로 희석하여 100 μ l씩 가하고, 실온에서 40분 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer에 0.1% ABTS (Sigma, U.S.A.)와 0.02%의 과산화수소를 함유한 액을 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 40분 반응시킨 후 405nm (referance 파장 492nm)에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA 결과 흡광도가 2.0이상이 되는 clone들은 따로 선별하여, 일부는 우선적으로 동결시켜

보관하며, 제한희석법 (0.5 cell/well) 으로 특이항체를 분비하는 clone을 선별하였다. 선별된 hybridoma는 추가적인 배양을 실시한 후 복수생산에 사용하였다.

(가) *P. larvae* flagella에 대한 단일클론항체

그림 9는 고역가를 보이는 hybridoma 클론들을 수차례 계대하며 특정한 항체분비능의 변화상태를 나타낸 것이며, 다수의 클론 중 역가의 안정성을 보이는 클론은 2G6, 3D2, 5G9로 선택하여 복수를 생산하여 복수상태에서의 역가를 확인하였다(그림 10). 또한, 1차년도에 작출한 Pc01은 10^6 에 가까운 고역가를 나타내었으며, 2G6 및 4D7의 경우도 10^5 배 이상의 역가를 나타내어 제품화에 적용할만한 정도의 수준을 보여주었다. 한편, 단클론항체의 pair는 Pc01과 그 외의 3종 클론과 반응하는 항원결정기가 상이한 것으로 판단되나, 의미있는 차이로 판단되지 않았다. cell이 손상되지 않은 상태의 fresh한 조건에서 재확인 필요한 것으로 사료되었다.

한편, 각 mAb 들간의 Epitope 교차반응을 보기 위하여, 항원이 흡착된 plate에 clone들을 조합하여 가한 후 반응정도를 비교해 보았으며 (표 2.) 동일한 2G6의 혼합에서 가장 강한 반응이 보였다. 이는 항원 구조가 반복되는 flagella 항원의 특성상 동일 clone일지라도 경쟁(competition)의 영향이 적었던 것으로 사료된다. 이러한 결과는 시작품제작시의 immunochromatography의 구성에도 유사한 결과로 나타났으며, 그 원인에 대해서는 추가적인 고찰이 필요할 것으로 판단된다.

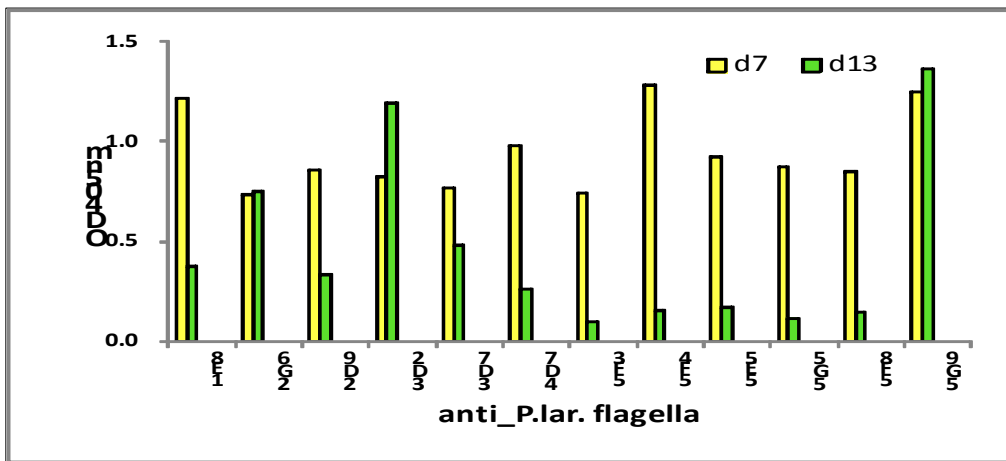


Fig 9. Changes of antibody secretion in the selected hybridoma clones

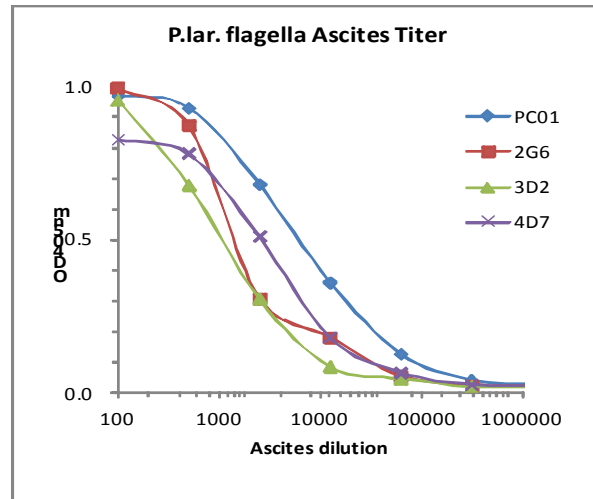


Fig 10. ELISA titers of ascites raised by hybridoma clones

Table 2. Cross binding reaction among the hybridoma clones

Clones	Ascites Dilution			
	500	250	250	50
	PC01	2G6	4D7	3D2
pc01	1.113	1.21	1.211	1.326
2G6	1.221	1.395	1.341	1.409
4D7	1.177	1.319	1.107	1.185
3D2	1.293	1.31	1.111	1.216

(나) *P. larvae* spore에 대한 단일클론항체

*P. larvae*의 spore를 BALB/c 마우스에 과면역시켜 검사한 혈청의 항체강도 그림 11과 같이 10^5 배 이상의 역가를 보였으며, 충분한 면역이 이루어진 것으로 판단하여 hybridoma 개발을 위한 fusion을 수행하였다. 다수의 클론 중 1D7의 경우는 culture sup의 상태에서도 10^3 이상의 역가를 보였으며, 복수의 상태에서는 10^6 수준의 특이한 고역가를 보여주었다. Detector의 pair로는 1D7, 4D6, 5D11과 5C6, 그리고 4F8이 각각 서로 다른 항원결정기를 인지하는 것으로 판단되어 가장 역가가 높은 1D7을 tracer로, 5C6 과 4F8를 혼합하여 capture로 사용하여 제품화에 적용함이 이상적일 것으로 판단하였다 (표 3).

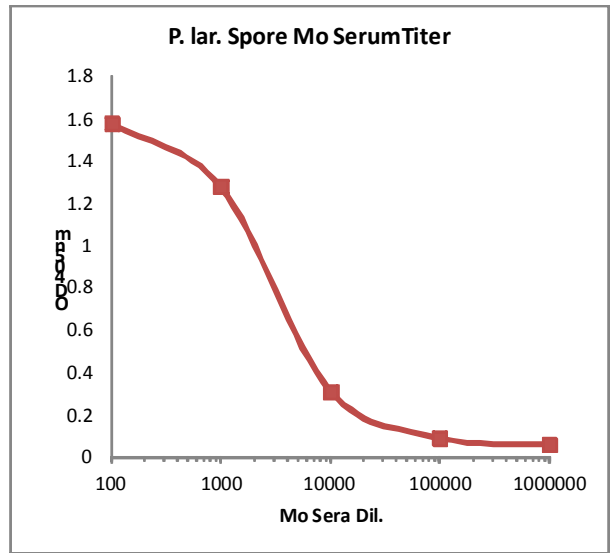


Fig 11. ELISA titer of hyperimmunized mouse serum

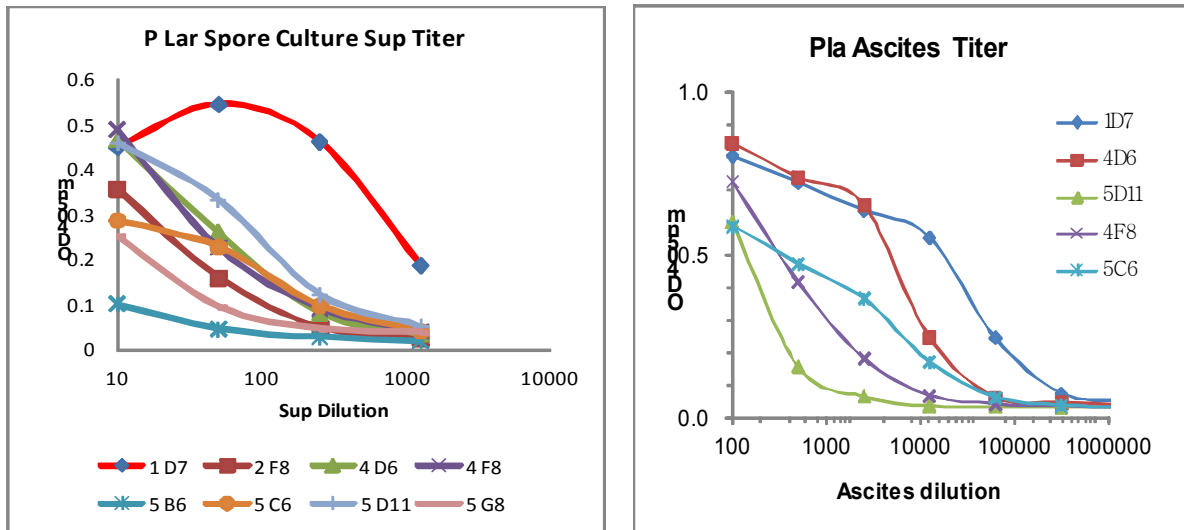


Fig 12. Titer of anti-*P. lar.* spore hybridoma culture supernatanes and ascites

Table 3. Cross binding reaction among monoclonal anti-*P. lar.* spore

Clones	1d7	4d6	5d11	5c6	4f8
1d7	0.894	0.958	0.972	1.213	1.301
4d6	1.03	1.121	1.086	1.302	1.364
5d11	1.04	1.039	1.034	1.263	1.325
5c6	1.36	1.242	1.274	0.645	1.195
4f8	1.252	1.372	1.271	1.127	0.953

(4) 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 세포접

종 1주일 전에 미리 pristane (Sigma, U.S.A.)을 0.5ml씩 복강 내로 접종하여 감염시켜 놓았다. 이 후 약 10일간 복수형성 상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 -20°C 냉동보관하며 MAb 정제에 사용하였다.

(5) 단클론항체의 정제

Protein G sepharose 4B gel (Pharmacia LKB, Sweden)을 이용하여 복수 중의 IgG를 정제하였다. 복강에 접종하여 얻은 복수는 PBS로 5배 희석한 후 컬럼에 가하였으며 (0.3ml/min), 이 후 세척은 PBS로, 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 회수된 IgG 분획은 10mM PBS, pH7.2 로 투석한 후, 단백질량을 측정하고, 제균 여과한 (0.22µm pore size) 다음, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

Hybridoma cell을 접종하여 얻은 복수로부터 Protein G sepharose 4B를 이용하여 각 단클론항체를 정제한 프로파일은 그림 13.에 나타내었다.

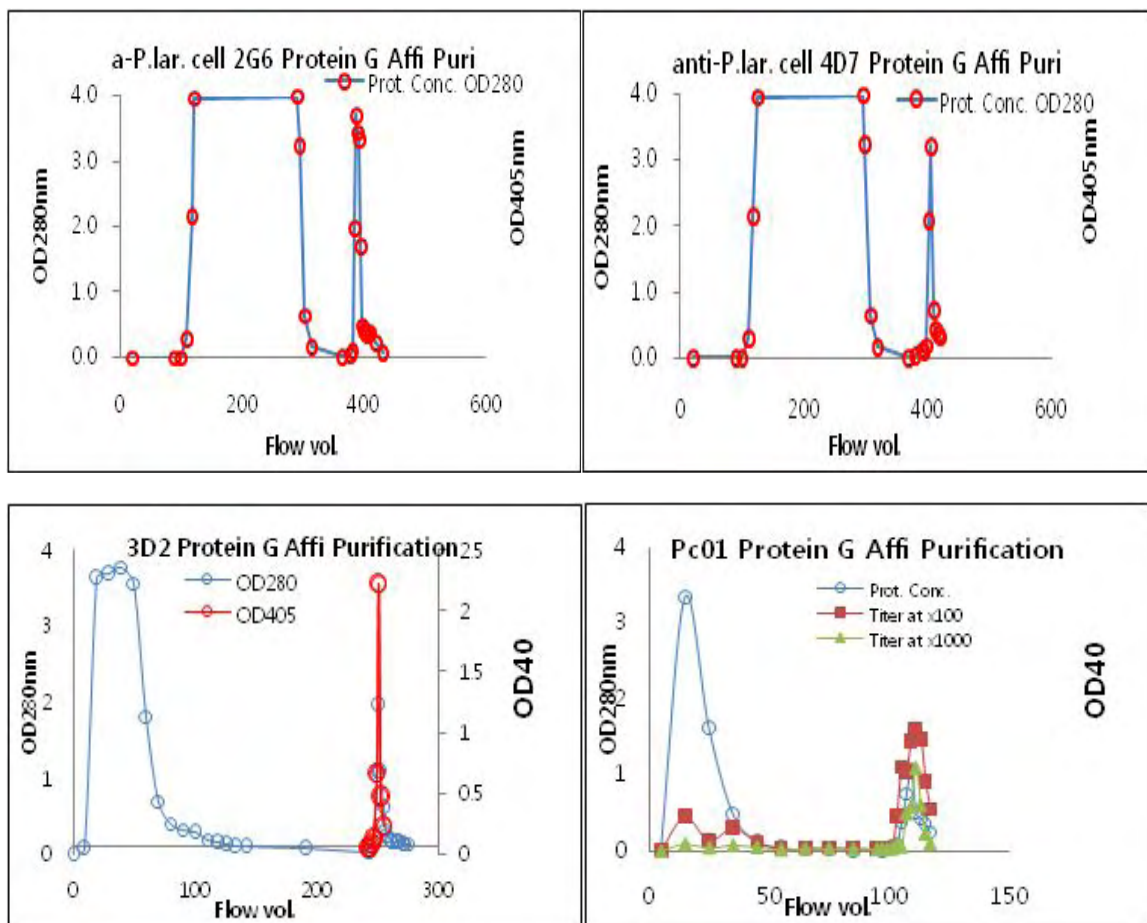


Fig 13. *P. larvae* flagella에 대한 MAb의 정제.

정제된 각 단클론항체 분획의 역가는 그림 14.에 나타내었다. 특이하게도, AFB의 원인체인 *P. larvae* 의 flagella에 대한 단클론항체는 Protein G sepharose 4B로 정제를 실시하였으며, 당연히 IgG type으로서의 역가를 나타내고 있으나, anti-Mouse IgM type의 2차항체와도 일정한 역가를 나타내었다. 이러한 현상은 본연구과정 중 작출된 여타의 항원에서는 일어나지 않았다. 면역항원의 특성에 따라 형성되는 항체의 type에서 차이가 있을 것으로는 사료되나, Protein G와도 결합하며 동시에 IgM type의 성질을 띄는 이러한 단클론항체가 생성되는 현상에 대해서는 추가적인 고찰이 필요할 것이다.

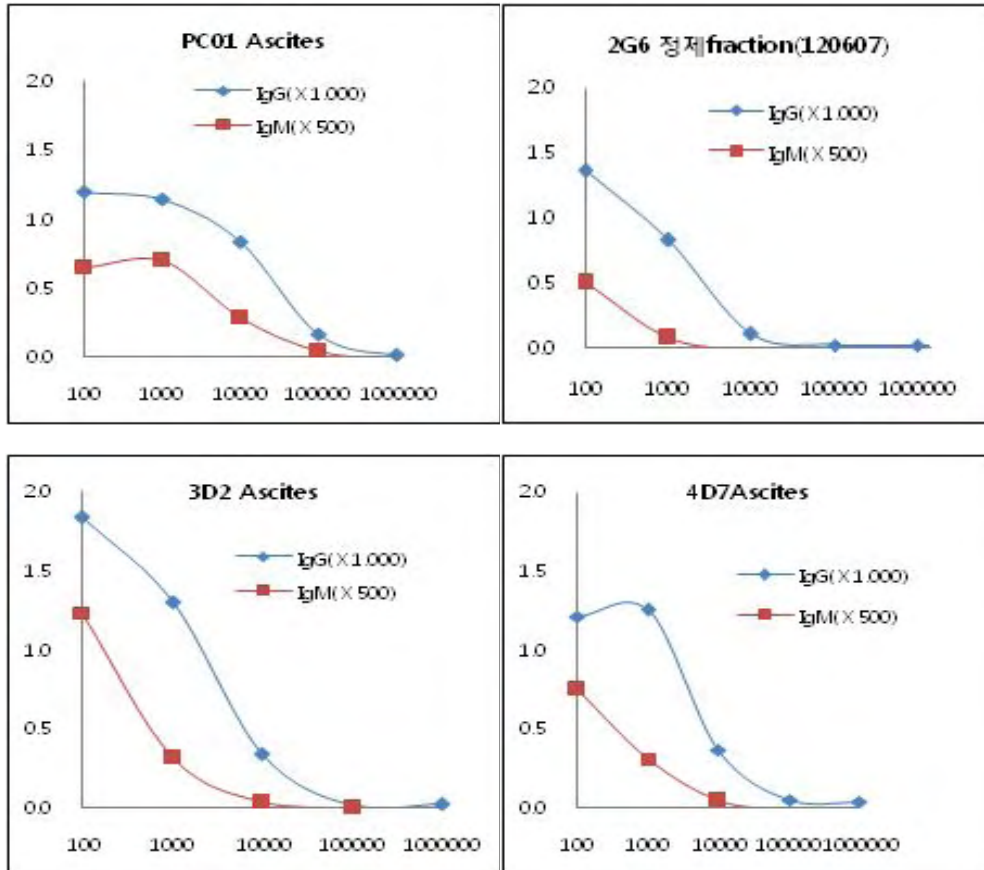


Fig 14. *P. larvae* flagella에 대한 MAb의 복수 및 정제분획의 역가.

그림 14에서 보듯이 goat, anti-IgG, 뿐 아니라 anti-IgM (μ chain specific)에 대해서도 일정한 정도의 항체가를 보이고 있다.

P. larvae 의 spore에 대한 단클론항체는 Protein G sepharose 4B로 정제를 실시하였으며, 그림 15에 나타내었다. 정제된 각 단클론항체의 역가는 그림16.에서와 같으며, 10^5 이상의 역가를 보였다.

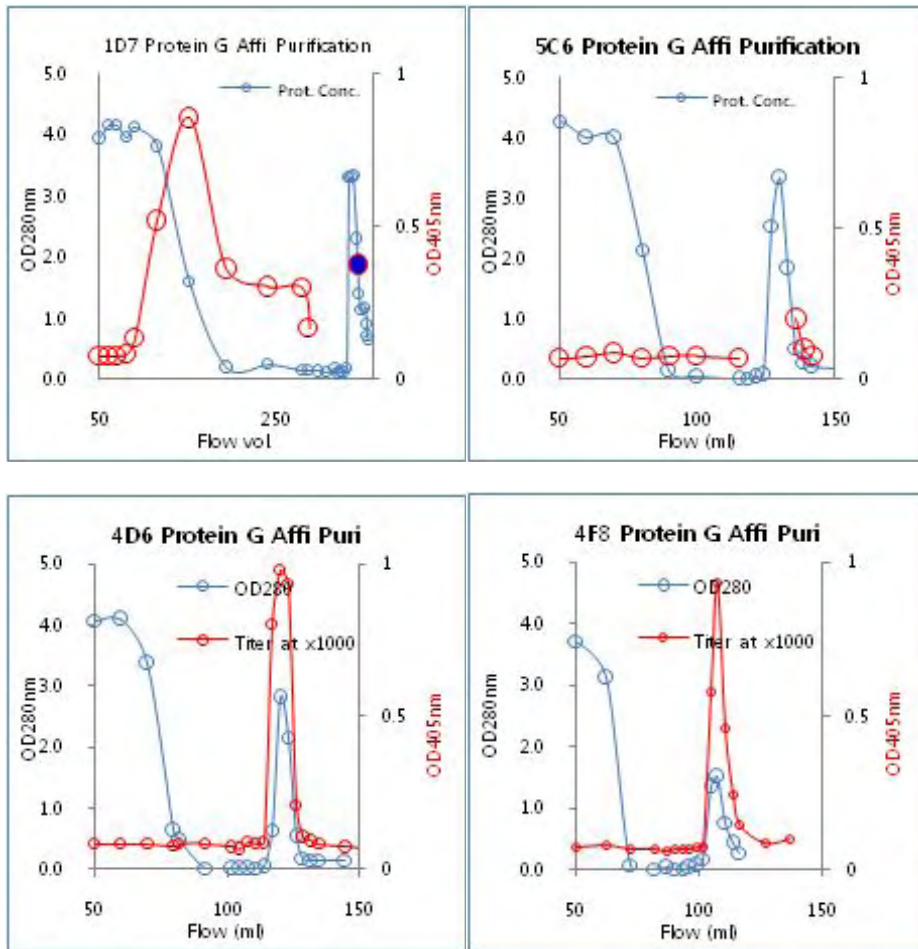
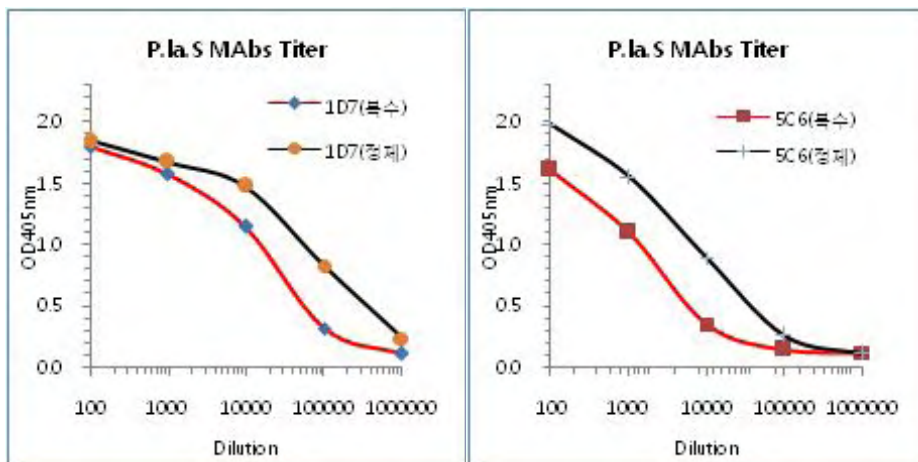


Fig 15. *P. larvae* 의 spore에 대한 단클론항체의 정제.



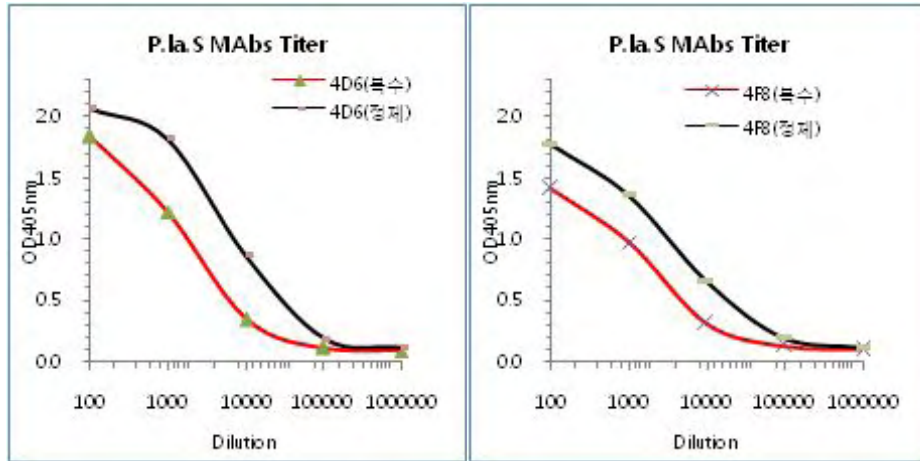


Fig 16. 정제된 *P. larvae* 의 spore에 대한 단클론항체의 역가.

라. ELISA system 개발

ELISA kit의 실행조건을 확립하기 위하여, *P. larvae*의 vegetative cell을 정량하기 위한 것으로 protein G로 정제한 Pc01을 tracer로서 Horese radish peroxidase와 접합시켰으며, 여분의 3종의 단클론 항체를 capture로 혼합 적용하여 ELISA 시스템을 구성하였다. *P. larvae*의 spore 검출에는 1D7을 tracer로, 5C6 및 4F8을 capture로 구성하여 ELISA 시스템을 구성하였다.

(1) HRP-MAb conjugates

Wilson과 Nakane (1978)의 방법에 의해 수행하였다. 즉, HRP (RZ=3.0) 5mg을 1.2ml 증류수에 녹인 후 0.1M NaIO₄ (Sigma, U.S.A.) 300 μ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들여 주었다. 이후 단클론항체를 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들여 준 후 NaBH₄ (4mg/ml)(Sigma, U.S.A.)을 100 μ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 투석한 후 냉장에 보관하며 사용하였다. 접합체의 안정을 위하여 BSA (Sigma, U.S.A.)를 10% 되게 가하고 0.02%되게 thimerosal (Sigma, U.S.A.)을 가하여 주었다. Pc01과 접합된 HRP conjugates는 그림 17과와 같이 접합전 정제 Pc01, 1D7과 동등한 titer를 나타내었으며, ELISA system에 적용이 적합한 것으로 판단되었다.

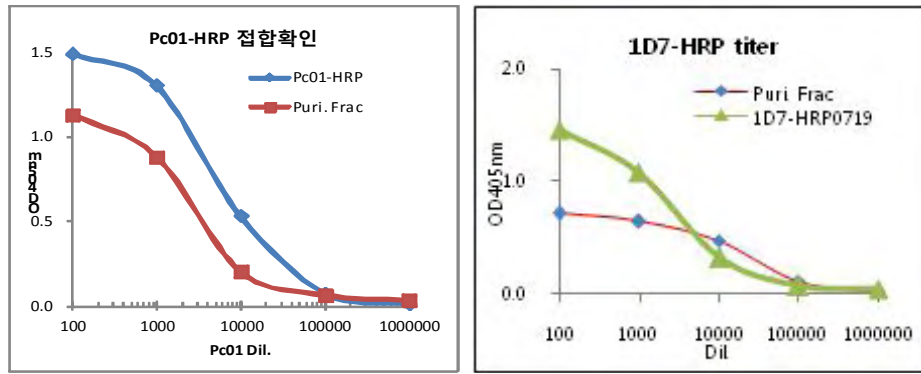


Fig 17. HRP labeled Pc01 and 1D7 shows almost same ELISA titer with intact purified Pc01 or 1D7.

(2) 단클론항체 coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원으로 약 $5\mu\text{g/ml}$ 되게 흡착 buffer로 희석하고, 이를 96-well ELISA plate (Nunc polysorb, Demark)에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C 의 항온기에 2시간 정치한 후 4°C 의 냉장고에 정치시켜 16시간 흡착시켰다. 여분의 면적은 0.2% BSA-PBS를 $200\mu\text{l}$ 가하고 4°C 에 2시간 정치하여 봉쇄(blocking)하였다.

(3) Antibody pair 결정

준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 아포 부유액을 PBS-T에 희석하여 well당 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이 후 각각의 HRP-MAb 접합체를 conjugate buffer에 적절히 희석하여 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 실온에서 30분간 방치한 후에 PBS로 3회 세척하였다. 발색액을 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 30분 후에 이를 405nm (대조파장 492nm)에서 흡광도를 측정하여, 각 단클론항체의 조합중 발색반응이 가장 우수한 pair를 흡착용 항체 및 접합체 제조용 항체로 선정하였다.

(4) Sandwich ELISA를 위한 capture항체와 detector항체의 조건 조사

Antibody pair로 결정된 각각의 항체 pair를 사용하여 배양된 *P. larvae*의 아포를 검출하기 위한 항원을 통하여 ELISA 최적조건을 설정하였다. 세척은 각 단계마다 PBS로 3회 실시하였다. 검사시료 및 효소접합체의 희석은 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 계단 희석하여 40분간 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 0.2%의 ABTS액을 사용하여 30분간 반응시켰다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다. 즉, 꿀벌유충의 사체를 microcentrifuge tube에 넣고 $200\mu\text{l}$ 의 PBS-T를 가한 후, microcentrifuge tube용 plastic 봉(disposable plastic pestles, conical, 70mm, Biobasic inc.)으로 마쇄하고 20초간 원심분리하였다 (3,000 rpm). 원심상층액은 따로 회수하여 ELISA를 실시하였다.

(5) Sandwich ELISA를 위한 균체항원 처리조건

Immunoassay를 위한 bacteria 및 그의 spore는 그 size가 너무 크기 때문에 단계별 세척과정에서 immunoglobulin과 결합했음에도 불구하고 탈락되는 경향을 보였기 때문에 정상적인 분석이 어려웠다. 그림 12. 에서와 같이 eosine으로 염색한 *P. larvae*의 균체 및 아포, 그리고 *M. plutonius* 균체는 pore size가 가장 큰 75" membrane에 전개하였을 때도 flow가 이루어지지 않고 정체되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 현장적용 kit인 Immunochromatography 개발에도 필연적으로 장애가 되는 사항이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, glass bead (0.1mm, BioSpec Products, Inc. USA) 및 zirconia/silica bead (0.1mm dia., BioSpec Products, Inc. USA)를 검사시료에 가하고 교반하여 균체 및 아포항원을 처리하였을 때 그림 18같이 항원성분의 flow가 확인되어 이를 응용한 조건을 수립하였다.



Fig. 18. 균체항원의 파쇄에 따른 particle size의 변화.

처리하지 않은 균들의 경우는 flow가 일어나지 않고 있으며(좌) zirconia 혹은 glass bead로 마쇄한 시료는 조건에 따라 flow가 일어나고 있다(우).

(6) ELISA의 검출감도

미국부저병의 실험실적 검사를 위하여 개발한 ELISA의 검출한계는 그림 19와 같이 vegetative cell의 경우 10^5 cell/ml까지 검출가능하였으며, $100\mu\text{l}$ 의 시료량으로 계산한다면 10^4 cell까지 검출가능하였다. spore의 경우는 vegetative cell의 경우보다 다소 낮으나 역시 10^4 spore의 검출이 가능하였다.

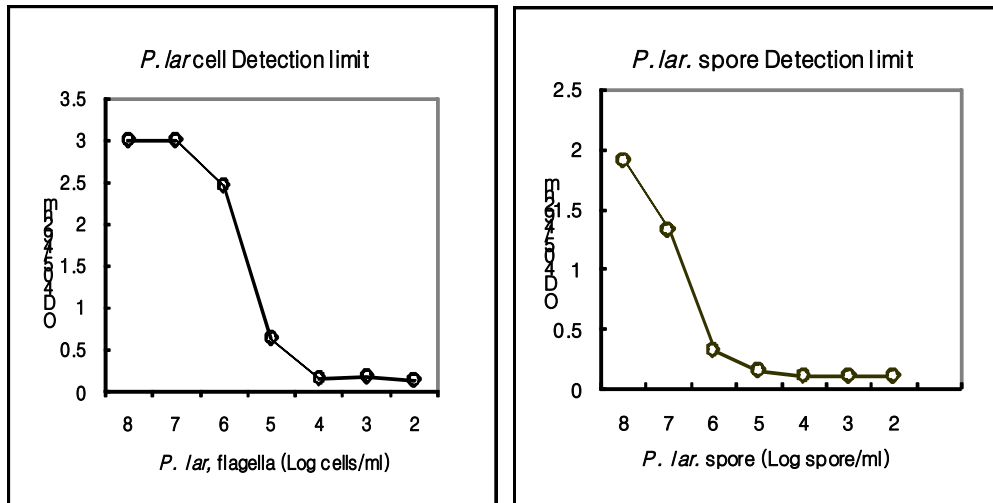


Fig 19. P. larvae cell 및 spore 검출용 ELISA의 detection limit

마. Immunochromatographic assay 법의 개발

현장 래피드 진단법은 특별한 훈련이 되어있지 않은 일반 양봉가에서 적용하기에 적합한 형태의 진단 법이다. 특히, kit의 구성이 단순하고, 파이펫을 대체할 수 있는 간이 스포이드 등이 구성내용 중에 있으므로, 현장에서 신속진단이 가능하다. 시제품은 진단전문회사인 ‘바이오노트’사에 제작 의뢰하였다.

(1) Colloidal gold 접합체 제조

전통적으로 Immunoglobulin G type의 항체를 흡착시킬 collidal gold는 40nm의 구경이 가장 적절한 것으로 통용되고 있다. 먼저 20nm 구경의 gold colloid를 제작한 후, 40nm 구경이 되도록 seeding 과정을 통하여 만족할 수준의 gold particle을 제작하였다.

(가) 20nm colloidal gold (100ml)의 제조

삼차증류수 89ml를 hot plate magnetic stirrer를 사용하여 60 °C로 가열하고, 1% gold chloride (Fluka, switzerland) 1ml을 가하여 0.01%되게 하였다. 이 후, 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 4ml에 증류수 6ml을 섞고, 가열된 gold chloride의 중앙에 즉시 가하였다. 용액이 적색으로 변할 때까지 약 50분 정치하였고, 5분간 끓인 후 냉각하여 사용하였다. 사용된 모든 용액은 주사용수[®] 삼차증류수로 조제하였다. 제조된 20nm 구경의 plain gold는 528nm에서 최대의 흡광을 나타내었다.

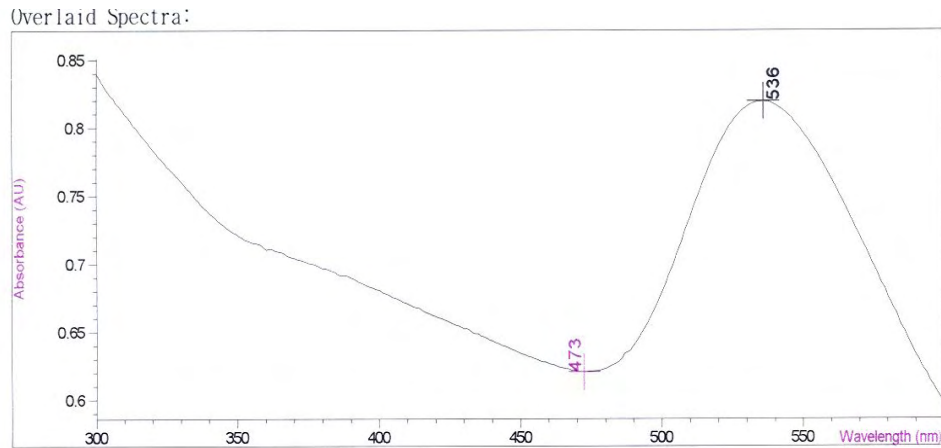


Fig 20. Absorbance spectrum of 20 nm colloidal gold

(나) 40nm colloidal gold (100ml)의 제조

만들어진 20nm gold 25ml에 물 153ml를 가한 다음 끓였다. 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 2ml을 가하여 0.01%가 되게 하였다. 1% gold chloride 2ml를 물 18ml와 섞은 후 1ml/min 정도로 점적하였다. 이후 온도를 유지하며 20분간 끓인 후 실온에 방치하여 사용하였다. 제조된 40nm 구경의 plain gold는 536nm에서 최대의 흡광을 나타내었으며, 이를 기준으로 plain gold의 대략 size의 추정이 가능할 것으로 판단된다.

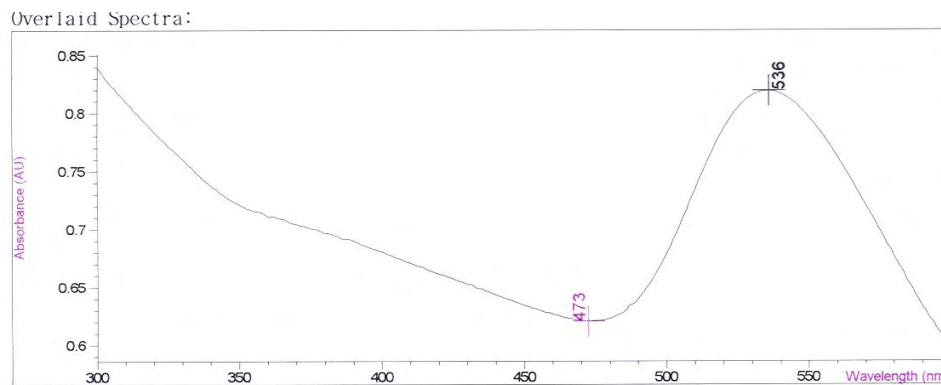


Fig 21. Absorbance spectrum of 40 nm colloidal gold.

(다) Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위하여 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1mg/ml이 되게 하였다. plain gold의 산도는 0.1% NaOH (Sigma, U.S.A.)로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정 한 plain gold 10ml에 항체를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA (10 μ l of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후 이를 원심분리 (10,000 \times g 30분, 4 $^{\circ}$ C,

Kontron T-324, Italy)시켜 맑은 상층액을 걸어내고 gold 접합액 (1% T-20, 1% BSA, 2-3% sucrose, in 100 mM PB)에 재 부유하였다.

(2) Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP003, U.S.A.)을 5mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체(10mg/ml)를 2.0 μ l씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 ICA를 실시하였다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료의 준비는 ELISA의 경우와 동일하게 수행하였다.

P. larvae flagella detection으로는 Detector로서 Pc01, Capture로 2G6 clone을 채택하였으며, spore detection 용으로는 Detector로 1D7, Capture로 5C6을 매칭시켜 kit을 구성하였다.

그림 22는 시작품으로서, 제작한 미국부저 flagella에서는 균마쇄여부와 관계없이 강한 detection 능을 보이고 있으며, 미국부저 원인균의 아포와 유럽부저균의 반응은 상대적으로 미약하게 발현하고 있다. 이러한 부분은 시작품 제작업체에 기술지도를 통하여 항원처리의 조건과 시료희석액의 조건을 강도를 높여서 품질성능을 높임이 바람직하다.

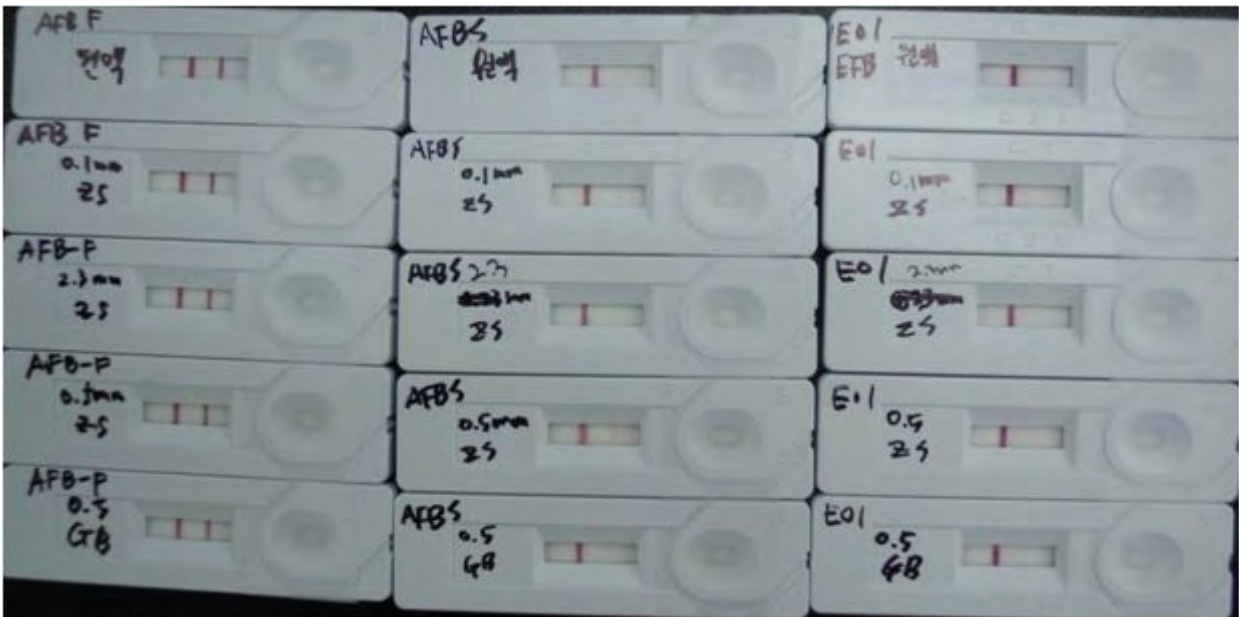


Fig. 22. 미국부저 및 유럽부저 현장검사용 immunochromatography kit 시작품의 준비.

제 2 절 유럽부저병 검색을 위한 신규 검출법의 개발

1. 유럽부저병의 원인균 *Melisococcus plutonius*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발

가. 서론.

본 연구는 유럽부저병 (European Foulbrood); EFB)의 원인균인 세균, *Melisococcus plutonius*를 보다 정확히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, *Melisococcus plutonius*의 DNA Gyrase subunit B의 특이 염기서열을 검출목적물로 하였다. EFB의 검출을 위한 본 연구는 *Melisococcus plutonius*에 대한 최초의 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)법을 적용한 검출법임을 밝히고, 이 내용은 Journal of Apiculture 27(1)에 “Development and clinical validation of a DNA gyrase subunit B gene based loop mediated isothermal amplification method for detection of *Melissococcus plutonius*”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) EFB-검출을 위한 Primer들의 염기서열

Table 1. Primers of the molecular cloning and the LAMP-detection for *M. plutonius*

	Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	F	CCCGTCGACATGTTTCAAGCTATTTTGCC
	B	ACG TTCAGGATCCATGGTCGTCTCCAC
LAMP	F3	CGCCAATTGTTGAAGCT
	B3	CGTCTCCCACAATTGATGA
	FIP (F1c+EcoRI+F2)	TCCCCGGCTGAACATAAGTAATATTgaattcTGTTTATATTGCCAACCAC
	BIP (B1c+EcoRI+B2)	ATCTCATTTGATGGAACTTTGCCAgaattcTAATCCCTTGTATCGTTGAAC

다. 결과 및 고찰

(1) EFB-검출을 위한 최적 LAMP의 조건들

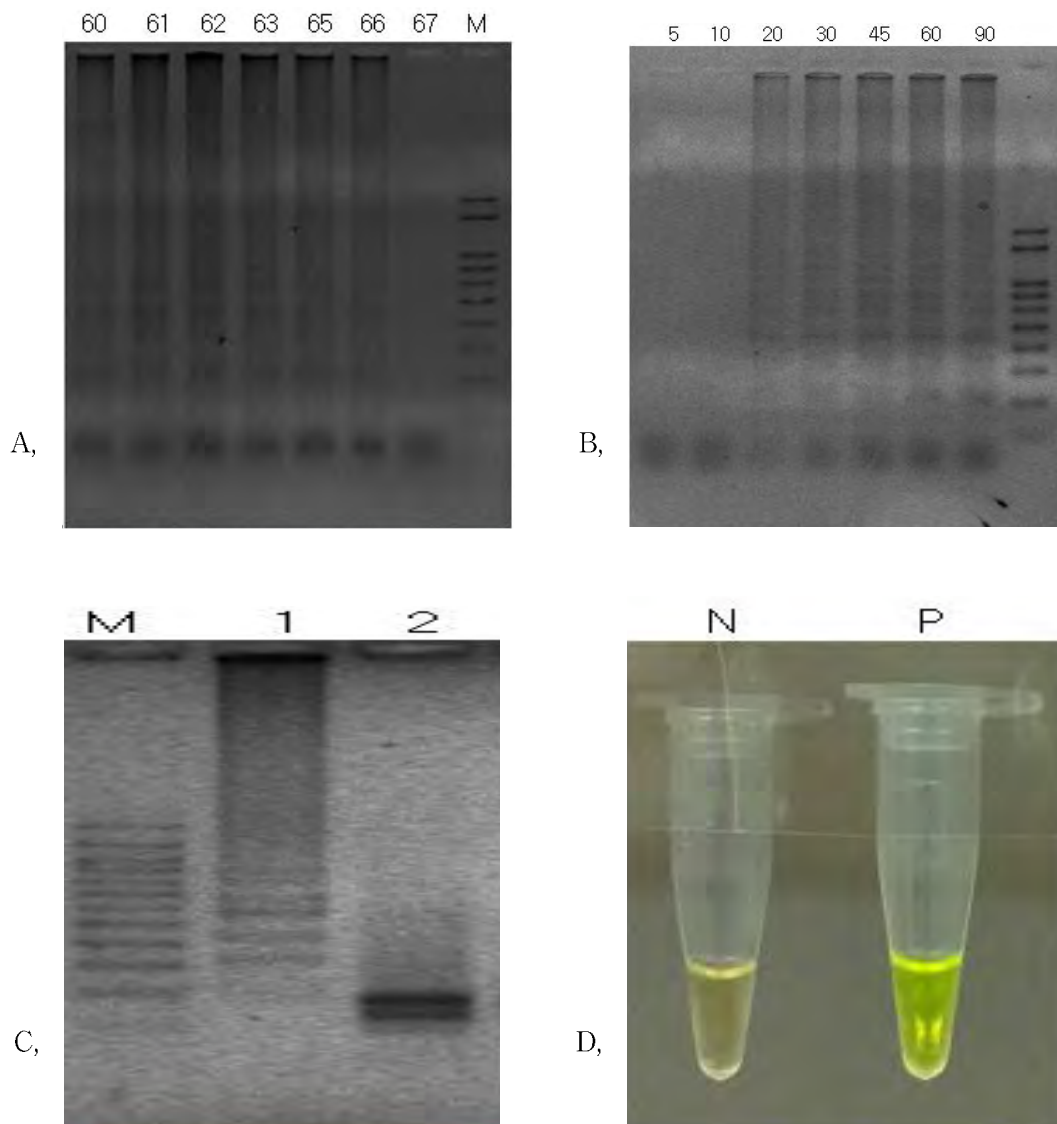


Fig.1. Determination of optimal temperature, time incubation of LAMP, and verification.

(A) Determination of optimal temperature. Lane M: Forever marker; lanes 60-67: LAMP carried out at 60, 61, 62, 63, 65, 66 and 67°C, respectively. (B) Determination of optimal time. Lane M, 10 kb ladder marker; lanes 5-60, LAMP carried out for 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 min, respectively. (C) Verification of the specificity of primers. Lane M: forever marker (Seegene, Seoul, Korea); 1, LAMP products from EFB clone; 2, *EcoRI* digested of EFB-LAMP products. (D) Directional inspection of LAMP products by GeneFinder in daylight. A positive reaction shows green florescent, while orange is florescent of negative reaction.

(2) EFB-검출을 위한 LAMP법과 기존 PCR법의 민감도 비교

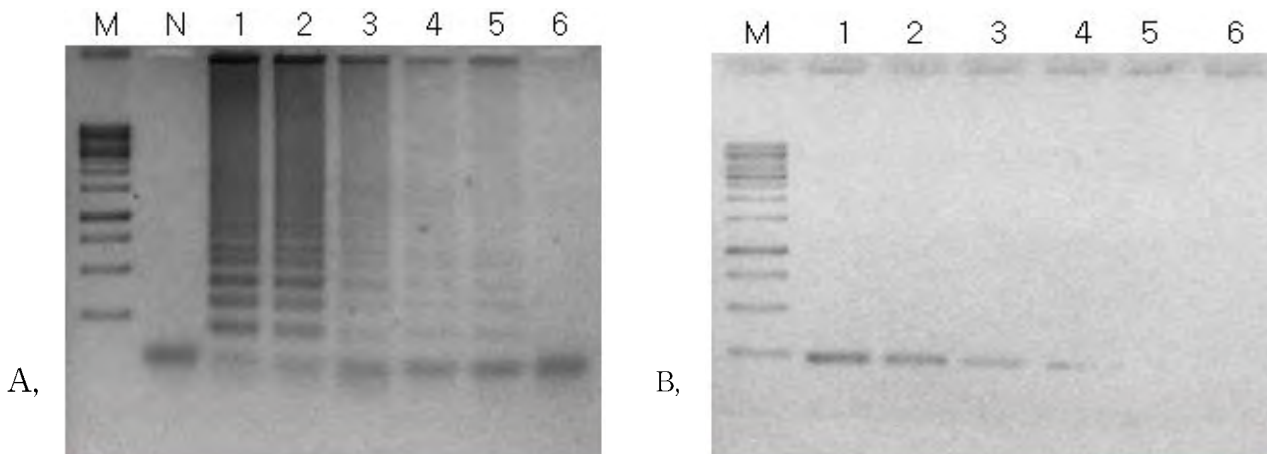


Fig. 2. Sensitive detection of EFB-LAMP and conventional PCR

Both LAMP and PCR methods were performed by preparing 10-fold serial dilutions of the plasmid (pBX-Egyr1). Lane 1-6: 6×10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , and 6 copies, respectively. Lane M, 1 kb ladder marker; lane N, negative control (A) LAMP reaction, (B) PCR reaction.

The detection limit of EFB-LAMP was 6×10^1 copies (equivalent to 2fg of plasmid DNA) (lane 5, fig.2A), whereas 6×10^2 copies using conventional PCR were detected (equivalent to 20 fg of plasmid DNA) (lane 4, fig.2B), the EFB-LAMP method was 10 times more sensitive than conventional PCR.

(3) EFB-LAMP법의 정확성



Fig.3. Specificity of EFB-LAMP assay

Lanes: M, 1 kb ladder marker; 1 and 2, bacterial genome mixture without and with *M. plutonius*, respectively; 3, beegenome infected with EFB.

(4) 현장검사를 위한 EFB-LAMP법의 시각적 즉석 판정

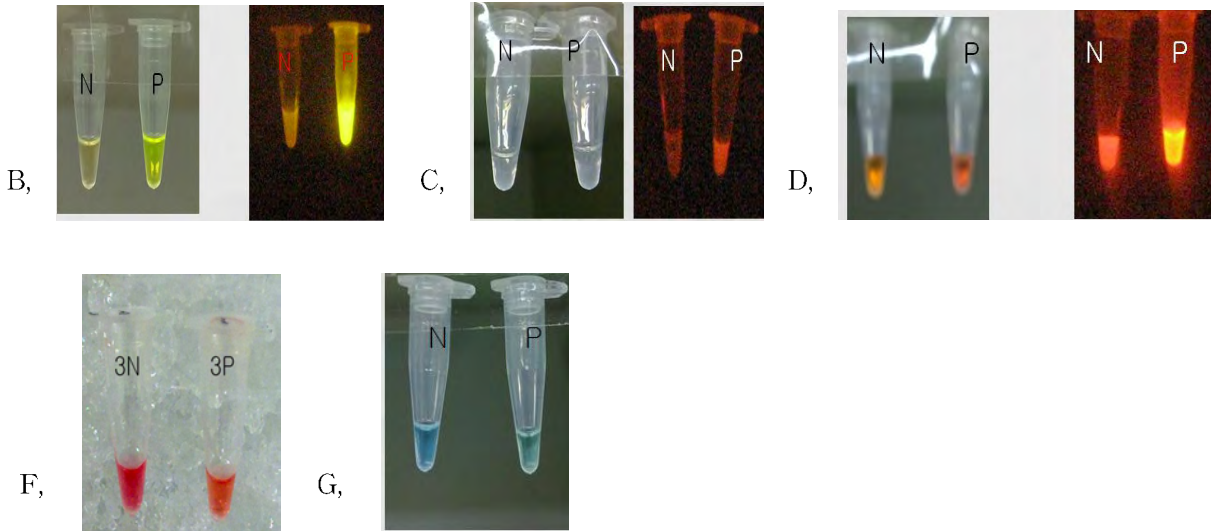


Fig.4. Visual detection of EFB-LAMP products

(A-D) Inspection of EFB-LAMP by using DNA interaction dye: SYBR green, Gen finder, Bigdye sequencing RR-100 and Ethidium bromide, respectively; E, inspection by Cacein metal indicator; F-G, inspection based on pH indicators. In all panels, N is negative reaction; P is positive. The left side is daylight inspection, whereas the right site is inspection under UV light except F, G.

2. 유럽부저병의 원인균 *Melisococcus plutonius*에 대한 면역학적 신규검출법의 개발

가. 서론.

본 연구는 유럽부저병 (European Foulbrood); EFB)의 원인균인 세균, *Melisococcus plutonius*의 체세포 항원을 기반으로 유럽부저병의 진단키트를 개발하고자 한 것으로, 기본적 실험방법은 제1절, 2에 기술한 미국부저병 특이항원 검출을 통한 미국부저병의 진단키트 개발과 동일하다. 본 키트의 시제품도 현재 개발완료되어, 미국부저병 진단키트 2종 (포자 검출용, 편모항원)과 함께 상업적 생산을 위한 최종 준비 과정에 있다.

나. 항원생산

(1) *M. plutonius* 항원의 준비

*Melisococcus pluton*은 절대 혐기 균으로 anaerobic gas mixture N₂ 90%, CO₂ 10%를 사용하며 배양온도는 30°C이며 Glove box에서 배양하였다. 배지의 혐기상태 확인을 위해서 Resazurin을 배지에 포함시켜 차후에 배지의 혐기상태를 재확인하였다. 초저온냉동고(-80°C)에

보관된 *Melissococcus plutonius*를 KS-BHA(37.0g Brain Heart Infusion(DIFCO,Inc), 20.4g KH₂PO₄, 10.0g Soluble Starch(SIGMA, Inc.), 18.0g Agar(DIFCO), 1000ml of DW)에 계대배양한 다음 단클론 항체의 개발을 위한 항원은 기본적으로 10장의 KS-BHA 배지에 도말 접종하여 마련하였다. PackAnaero(MGC, Inc)를 이용하여 혐기 상태로 37°C에서 4~7일 가량 배양 후 멸균 Saline과 면봉으로 균주를 부유시키고 15ml 시험관으로 옮겼다. 3000 rpm(1,300 x g)에서 15분간 원심분리 후 상층액은 버리고 pellet을 50mM phosphate buffer에 부유시켰다. 부유된 세균 배양액을 620 nm에서 OD 1.0으로 조정하였고 필요시까지 -80°C에 보관하였다.

Table 2. Composition of *Melissococcus plutonius* culture medium per liter

	component	amount to add per liter
<i>M. 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°C 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.

(가) 표면단백질 용해: 균체의 표면단백질 추출을 위하여 *Melissococcus plutonius*의 균액을 여러 가지 방법으로 처리하였다. 먼저 일반적으로 사용되는 SDS-PAGE lysis buffer를 이용하여 유럽부저균의 lysis 정도를 평가하였고, lysis buffer에 0.4% Tween 20, 0.4% Triton X100을 첨가하여 바로 lysis 시키거나 0.1mm zirconia/silica beads(BioSpec Products, Inc.)를 이용하여 균체를 파쇄하였으며, TE buffer에 부유된 균액을 직접 bead를 이용하여 파쇄한 것과 비교하였다. 방법을 간략히 기술하면, 먼저 0.1mm zirconia/silica beads(BioSpec Products, Inc.)를 2ml screw capped tube의 1/2 정도 첨가하였다. 다음 준비해 둔 균액을 시험관에 첨가한 후 Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, Inc.)에 장착하여. 최고속도(4800rpm)로 1-2분간

shaking하였다. 2분간 정지한 후 상층액을 1.5 ml microcentrifuge tube로 옮기고, -20°C 보관하였다.

(나) 표면단백질의 확인: 용출된 표면단백질은 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 먼저 bead 처리로 용출된 시료를 95°C, 15분간 열처리한 다음 상층액 100 µl를 동량의 2X SDS sample buffer와 혼합하였다. 이를 95°C에서 30분간 열처리한 후 15-25 µl를 SDS-PAGE에 사용하였다. SDS-PAGE는 10% running gel을 이용하였으며 Coomassie blue 염색으로 관찰하였다.

(다) 항원 준비: 사균화 항원은 보관된 균액을 최종농도 0.2% glutaraldehyde를 첨가하여 OD를 0.1로 조정된 후 30분간 방치한 다음 원심분리하여 상층액은 버리고 0.2% glutaraldehyde와 3.6% (wt/vol) formaldehyde가 첨가된 50mM phosphate buffer (pH7.5)용액을 첨가하여 1시간동안 고정하였다. 이 균액 0.4 ml을 마우스 면역에 사용하였다. 추출한 표면단백질은 lysis 결과에서 가장 우수한 TE buffer에 부유된 균액을 bead-beatter로 처리하여 얻은 시료를 100 µg/ml로 조정된 다음 Titermax gold adjuvant를 이용하여 항원을 준비한 후 0.4ml을 마우스 면역에 사용하였다.

일반적으로 세균의 SDS-PAGE는 배양균을 생리식염수에 부유한 후 2% SDS가 첨가된 SDS sample buffer에 부유하여 용균한 후 실시한다. 그러나 *M. pleutonius*의 경우 이러한 방법으로 용균이 되지 않아 SDS-PAGE를 실시할 수 없었다(Fig 5에 lane 1). 따라서 *M. pleutonius*의 표면단백질 추출을 위하여 미국부저균 및 결핵균의 추출방법을 사용하기 위하여 0.4% Triton X-100(Fig 5에 lane 3). 및 0.4% Tween20(Fig 5에 lane 4).이 첨가된 lysis buffer를 사용하였고, bead를 이용한 용출방법(Fig 5에 lane 5, 6)을 동시에 실시하였다. Tween 20 첨가에 의해 표면단백질의 lysis가 다소 촉진(Fig 5에 lane 6)되는 경향은 있었으나 그 정도는 미미하였다. 그러나 준비된 균액을 TE buffer에 부유한 다음 bead-beatter에서 1분과 2분동은 shaking 하는 방법으로 용출된 표면단백질의 경우 2분간 shaking 한 시료에서 충분한 양의 표면단백질이 SDS-PAGE 관찰되었다.

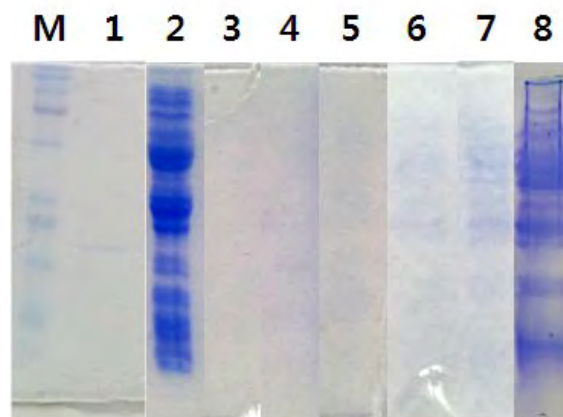


Fig. 5. SDS-PAGE using surface protein of *Mellisococcus plutonius*.

Lanes M, maker; 1, *M. plutonius* in lysis buffer; 2, *E. coli* in lysis buffer; 3, *M. plutonius* in lysis buffer with 0.4% Tween20; 4, *M. plutonius* in lysis buffer with 0.4% Triton-X100; 5, *M. plutonius* in 0.4% Tween20 + bead-beatter 1m; 6, *M. plutonius* in 0.4% Triton-X100 + beadbeatter 1min; 7, *M. plutonius* in TE buffer + Beadbeatter 1min; 8, *M. plutonius* in TE buffer+ bead-beater 2min

(2) 유럽부저균 (*Melissococcus plutonius*)의 새로운 분리방법 제안

대부분의 세균은 SDS-PAGE buffer에 의해 lysis되어 사멸하지만 *M. plutonius*의 경우 2% SDS가 첨가된 lysis buffer에 의해 lysis되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 이를 이용한 분리 방법을 개발하였다. 혐기상태에서 4일간 배양된 *M. plutonius*를 1.5×10^3 CFU/ml로 조정 한 후 최종농도 2%의 SDS를 첨가하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 KS-BHI 배지에 도말접종한 후 혐기 상태로 4-7일간 관찰하였다. 대조군으로는 SDS를 처리하지 않은 *M. plutonius* 및 SDS를 처리한 *Staphylococcus pseudintermedius* 균을 사용하였고, *S. pseudintermedius*의 경우 증식 여부를 혈액배지에서 관찰하였다.

결과적으로, SDS를 처리한 대조군이나 처리하지 않은 실험군 모두 배양 4일부터 colony가 관찰되었으며, 균수의 경우에도 처음 $1.5 \pm 0.3 \times 10^3$ CFU/ml에서 배양 7일까지 관찰했을 때 $0.9 \pm 0.6 \times 10^3$ CFU/ml로 추정되어 대조군에 비해 유의성 있게 감소하지는 않았다. 대조군으로 사용된 *S. pseudintermedius*의 경우에는 SDS에 의해 완전히 억제되었다. 따라서 유럽부저병의 원인균 분리를 위하여 검체를 2% SDS로 전 처리할 경우 다른 오염균을 억제할 수 있어 부저병의 진단에 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. SDS에서의 *Melissococcus plutonius*의 생존성

실험군	접종균수(CFU/ml)	배양균수(CFU/ml)
<i>M. plutonius</i> w/ SDS	$1.5 \pm 0.3 \times 10^3$	$0.9 \pm 0.6 \times 10^3$
<i>M. plutonius</i> wo/ SDS	$1.5 \pm 0.3 \times 10^3$	$1.4 \pm 0.4 \times 10^3$
<i>S. pseudintermedius</i> wo/ SDS	$2.3 \pm 0.5 \times 10^3$	NG

w/, with; wo/, without; NG, no growth

다. 마우스의 면역

면역항원을 준비하기 위하여 생리식염수로 세척하고 -80°C에 보관한 *P. larvae* 균체 및 아포 (Cell 항원: 약 0.6OD_{620} , Spore 항원 약 1.7OD_{620}), *M. plutonius* 균체항원(약 5.5OD_{620})를 0.2% glutaraldehyde 에서 30분, 0.2%glutaraldehyde / 3.6%formaldehyde에서 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 생리식염수에 재 부유시킨 후 소분하여 다시 -70°C에 보관하며 마우스의 면역

에 사용하였다. (동물실험승인번호 2011-0003, 제주대학교 동물실험윤리위원회)

면역을 위한 항원은 침전용적 대비 2배 용적의 생리식염수에 부유시킨 후 마우스 한 마리당 균체항원 및 아포항원 50ul를 동량의 TiterMax (Sigma T2684, USA)에 유제화하여 7~8주령의 암컷 BALB/c 마우스의 등쪽 피하에 2~4부위로 나누어 접종하여 면역을 실시하였다. 초회면역 후 2주 이후에 각 동물별로 항체형성의 정도를 확인하며 개별적인 추가접종을 실시하였다. 최종접종 후 24시간 후에 경추탈구시켜 살처분하고 얻어낸 spleen 세포를 세포융합에 공여하였다.

라. Hybridoma 생산

최종접종 24시간 후에 경추탈구로 희생시킨 BALB/c 마우스의 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다. 적출한 비장은 70% ethanol에 침적한 즉시 꺼내어 washing media에 2회 침적하여 세척하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 미리 37°C로 가온한 heating block에 장착하여 사용하였다.

비장세포의 분리를 위하여 50ml tube 위에 멸균된 stainless steel mesh (400목)를 거치한 후 비장을 넣고 3ml 주사기로 비장 내에 washing medium을 주입시켰다. 외피를 제거하고 washing medium 20ml를 흘려주며 분리된 비장세포가 tube내로 주입되도록 하였다. 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)로 세척한 비장세포는 세척과 동시에 미리 mid-log phase 상태로 증식시켜 준비한 SP/2 myeloma cell을 50ml tube에 넣고 동시에 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)하여 3회 세척하였다. 원심분리 후 침전된 세포의 packed volume이 비장세포와 동일하게 되도록 myeloma 세포의 양을 조절하여 비장세포와 SP/2 myeloma cell을 혼합하였다. 이후 3회 더 원심분리(1500rpm, 4분, 실온)를 실시하여 혈청성분을 완전히 제거하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 tube 바닥에 얇게 골고루 퍼지게 한 후, polyethylene glycol 1500 (Roche, GmbH)을 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합이 완료된 세포들은 washing medium으로 3회 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)하여 세척하였다 (정우준, 2003).

침전된 세포를 HAT medium 80ml에 부유시켜 96 well tissue culture plate (Nunc, Denmark)에 150 μ l/well 씩 분주하였다. 분주 24시간이 경과 후, HAT medium을 5일 동안 추가하여 세포융합이 되지 않은 SP/2 cell을 사멸시키고, 융합된 hybridoma 세포만 선택적으로 배양하였다. 5일후 hybridoma 세포의 관찰이 확인되면, HT medium을 첨가시켜 주었다. 세포의 증식정도에 따라 배양액 교환주기를 조절하였다.

특이 항체를 분비하는 hybridoma clone을 선별하기 위하여 세포가 증식하여 well 바닥의

1/3 정도 채워졌을 때, 배양 상층액을 100 μ l씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 항원을 coating buffer로 희석 (10 μ g prot/ml)하고, 96well ELISA plate (Nunc maxisorb, U.S.A.)에 100 μ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 흡착시켰다. 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 3회 세척 후, 비특이적인 항체의 결합을 억제하기 위하여 0.2%의 bovine serum albumin (BSA) blocking 용액 200 μ l를 각 well에 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 정치하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 건조시켜 냉장보관하면서 hybridoma 선별을 위한 ELISA에 사용하였다.

배양된 hybridoma 세포 상층액을 100 μ l씩 ELISA plate well에 가한 후 실온에서 40분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-horse radish peroxydase (HRP) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 conjugate buffer로 희석하여 100 μ l씩 가하고, 실온에서 40분 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer에 0.1% ABTS (Sigma, U.S.A.)와 0.02%의 과산화수소를 함유한 액을 각 well에 100 μ l씩 첨가하고 실온에서 40분 반응시킨 후 405nm (reference 파장 492nm)에서 흡광도를 측정하였다.

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

마. Monoclonal Ab 생산 및 정제

특이항체를 분비하는 hybridoma clone은 BALB/c 마우스에 2 x 10⁶ cell 씩 접종하여 고농도의 단클론항체를 함유하는 복수를 생산하였다. 복수 생산용 마우스 (12주령, female)는 세포접종 1주일 전에 미리 pristane (Sigma, U.S.A.)을 0.5ml씩 복강 내로 접종하여 감각시켜 놓았다. 이 후 약 10일간 복수형성상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 냉동 보관 하였다.

단클론항체의 정제를 위하여 Protein G sepharose 4B gel (GE Healthcare)을 이용하여 복수 중의 IgG를 정제하였다. 복강에 접종하여 얻은 복수는 PBS로 5배 희석한 후 컬럼에 가하였으며 (0.3ml/min), 이 후 PBS로 세척하였다. 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 회수된 IgG 분획은 10mM PBS, pH7.2 로 투석한 후, 단백질량을 측정하고, 제균 여과한 (0.22 μ m pore size) 다음, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

Cell fusion을 통하여 선출한 *P. larvae* 아포와 특이적으로 반응하는 hybridoma clone 중 지속적인 계대를 통하여 안정적인 항체분비를 확인한 결과 E01, E02, E03의 3종 clone을 선택하였다. 이 clone들을 마우스에 접종하여 얻은 복수를 Protein G Sepharose gel을 이용한 affinity

chromatography를 통하여 정제한 단클론항체들의 역가를 ELISA로 측정한 결과는 그림 6와 7에서 보는 바와 같이 OD값이 0.1 이상으로 10^5 배 이상부터 역가를 나타내었다. 한편, affinity column을 통과한 복수액은 음성의 역가로 타나났으므로, 충분히 정제가 된 것으로 판단되었다.

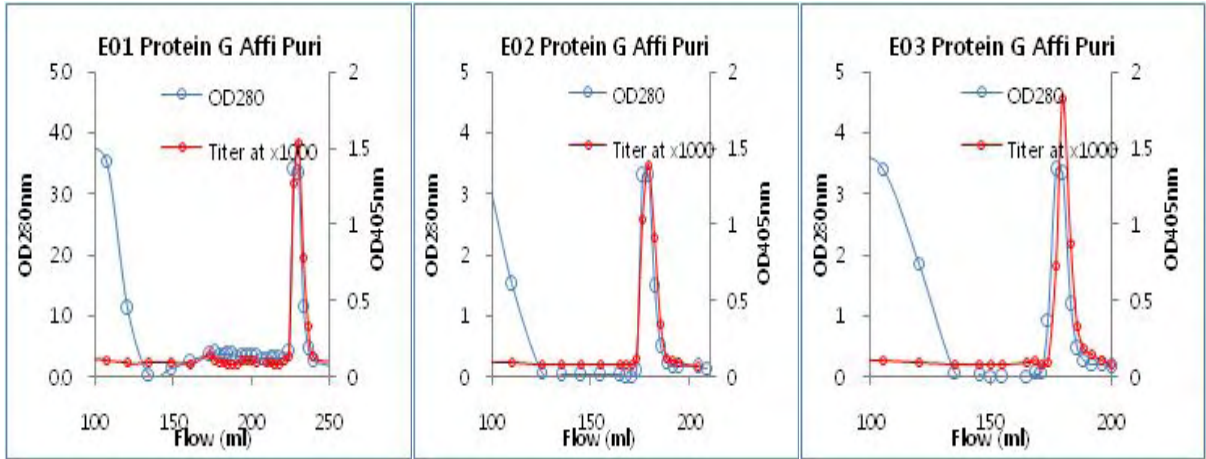


Fig 6. *M. plutonius*에 대한 단클론항체 정제 profile.

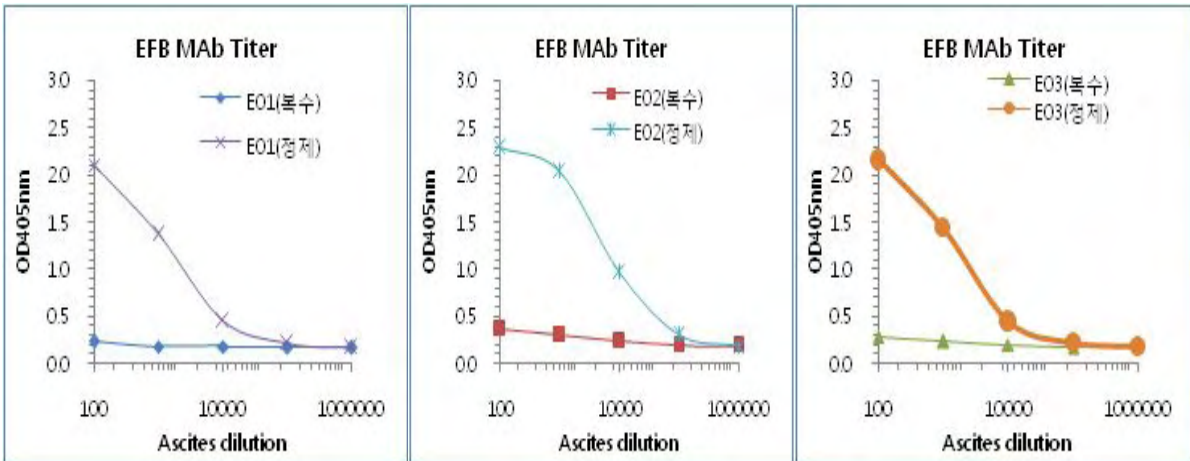


Fig 7. 정제된 분획과 recycle 용으로 보관한 ascites의 역가

바. 단클론항체의 특이도

본 연구에서 최종적으로 선정된 5종의 단클론항체들이 다른 세균들과 교차반응을 보이는가 알아보기 위하여, Table 4에서와 같이 소장중인 일반세균 13종을 대상으로 ELISA를 실시한 결과 공시된 세균들과 교차반응을 보이지 않았다.

Table 4. Specificity analysis of antibodies by ELISA with different bacterial species.

Bacterial strains	Monoclonal antibodies		
	E01	E02	E03
<i>Melissococcus plutonius</i>	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-
<i>E.coli</i> K88ab	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis</i> strain 1	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis</i> strain 2	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
<i>Micrococcus leutus</i>	-	-	-

사. ELISA

(1) HRP-MAb conjugates 생산

Wilson과 Nakane (1978)의 방법에 의해 수행하였다. 우선 HRP (RZ=3.0) 5mg을 1.2ml 증류수에 녹인 후 0.1M NaIO₄ (Sigma, U.S.A.) 300 μ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들여 주었다. 이후 단클론항체를 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들여 준 후 NaBH₄ (4mg/ml)(Sigma, U.S.A.)을 100 μ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 투석한 후 냉장에 보관하며 사용하였다. 접합체의 안정을 위하여 BSA (Sigma, U.S.A.)를 10% 되게 가하고 0.02%되게 thimerosal (Sigma, U.S.A.)을 가하여 주었다.

(2) 단클론항체 coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원으로 약 5 μ g/ml되게 흡착 buffer로 희석하고, 이를 96-well ELISA plate (Nunc polysorb, Demark)에 100 μ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C의 항온기에 2시간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 정치시켜 16시간 흡착시켰다. 여분의 면적은 0.2% BSA-PBS를 200 μ l 가하고 4 $^{\circ}$ C에 2시간 정치하여 봉쇄하였다.

(3) Antibody pair결정

Sandwich ELISA의 capture 및 detector의 결정을 위하여 정제된 항체를 각각 plate coating 및 효소 (HRP) 접합체를 제조한 후 *P. larvae* spore antigen (10⁸cell/ml)을 사용하여 분석하였다 (Table 5). Pla07을 capture로 사용하고 Pla06을 detector로 사용하였을 때 가장 강한 반응을 나타내었으므로, 추후의 실험에 Pla06 및 Pla07 clone을 적용하였다.

즉, 준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 아포 부유액을 PBS-T에 희석하여 well당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이 후 각각의 HRP-MAb 접합체를 conjugate buffer에 적절히 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주하고 실온에서 30분간 방치한 후에 PBS로 3회 세척하였다. 발색액을 100 μ l씩 분주하고 30분 후에 이를 405nm (대조파장 492nm)에서 흡광도를 측정하여, 각 단클론항체의 조합중 발색반응이 가장 우수한 pair를 흡착용 항체 및 접합체 제조용 항체로 선정하였다.

Table 5. Determination of antibodies pair of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen

		Detector		
		E01	E02	E03
Capture	E01	- ^a	-	+
	E02	-	-	+++
	E03	+	++++	++

^a The results of OD by sandwich ELISA. -, OD=0; +, OD \leq 0.5; ++, 0.5<OD \leq 1.0; +++, 1.0<OD \leq 1.5; +++, 1.5<OD \leq 2.0

(가) Sandwich ELISA의 검출한계 조사

Antibody pair로 결정된 각각의 항체 pair를 사용하여 배양된 *P. larvae*의 아포를 검출하기 위한 항원을 통하여 ELISA 최적조건을 설정하였다. 세척은 각 단계마다 PBS로 3회 실시하였다. 검사시료 및 효소접합체의 희석은 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 계단 희석하여 40분간 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 0.2%의 ABTS액을 사용하여 30분간 반응시켰다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료는 현 시점에서는 배양 균액 및 아포형성 배양액을 대상으로 실시하였다. 즉, 봉체내의 *P. larva* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 1 \times 10⁸, 1 \times 10⁷, 1 \times 10⁶, 1 \times 10⁵, 1 \times 10⁴, 1 \times 10³, 1 \times 10², 1 \times 10¹ spore/100 μ l 가 되게 희석한 다음 E02와 E03을 통하여 sandwich ELISA를 실시하였다. 그림 8과 같이 1 \times 10⁵ spore/ml의 검출감도를 보였다.

(나) ELISA kit의 민감도 및 특이도

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. 이는 미국부저의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어 있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리 동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 PCR 방법 (이 등, 2004)의 결과를 기준으로 비교하여 보았을 때 민감도 96.0%, 특이도 100%를 보였다 (Table 6).

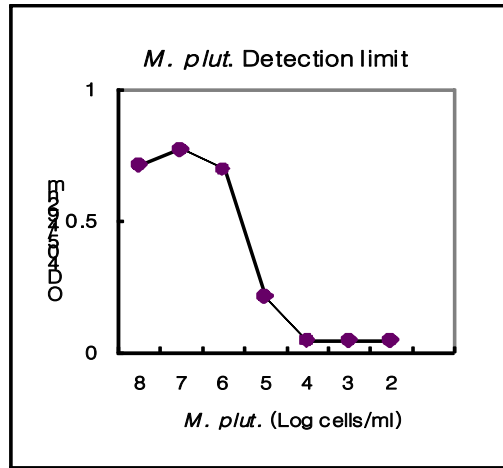


Figure 8. Limit of sandwich ELISA for the detection of *M. plutonius* antigen.

Table 6. The result of comparison PCR and Rapid kit

ELISA kit	PCR (Ref. method)		Total
	Positive	Negative	
Positive	48	0	48
Negative	2	54	56
Total	50	54	

가. Sensitivity: $48/(50) \times 100 = 96.0\%$, 나. Specificity: $54/(54+0) \times 100 = 100\%$

아. Immunochromatographic assay

(1) Colloidal gold 제작

(가) 20nm colloidal gold (100ml)의 제조: 실험실에서 제조한 3차 증류수보다는 품질관리가 되어있는, 주사용수[®] (중외제약) 89ml를 20 μ m pore size의 filter로 여과한 후, hot plate magnetic stirrer를 사용하여 60 $^{\circ}$ C로 가열하고, 1% gold chloride (Fluka, switzerland) 1ml을 가하여 0.01%되게 하였다. 그 후에 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 4ml에 증류수 6ml을 섞고, 가열된 gold chloride의 증양에 즉시 가였다. 용액이 적색으로 변할 때까지 약 50분 정치하였고, 5분간 끓인 후 냉각하여 사용하였다.

(나) 40nm colloidal gold (100ml)의 제조: 만들어진 20nm gold 25ml에 물 153ml를 가한 다음 끓였다. 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 2ml을 가하여 0.01%가 되게 하였다. 1% gold chloride 2ml를 물 18ml와 섞은 후 1ml/min 정도로 점적하였다. 이후 온도를 유지하며 20분간

끓인 후 실온에 방치하여 사용하였다

(다) Gold 접합체 제조 : Gold 접합체를 만들기 위하여 시작 조건은, plain gold의 OD₅₃₀ 값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1mg/ml이 되게 하였다. plain gold의 산도는 0.1% NaOH (Sigma, U.S.A.)로 맞추다가 미세조정 시점에서는 0.01% NaOH를 사용하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 10ml에 항체를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9.0까지 올린 후 BSA (10 μ l of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후, 이를 원심분리 (10,000 \times g 30분, 4 $^{\circ}$ C, Kontron T-324, Italy)시켜 맑은 상층액을 걷어내고 gold 접합액 (1% T-20, 1% BSA, 2-3% sucrose, in 100 mM PB)에 다시 부유시켰다. 전자현미경으로 확인하였을 때 그림 9에서와 같이 각각 20nm 및 40nm 구경의 입자가 확인되었다.

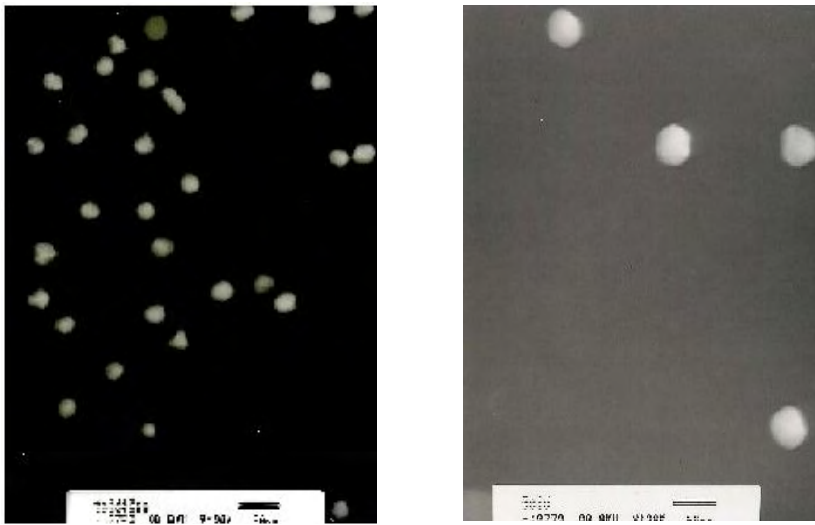


Figure 9. Transmission electron micrograph of 20 nm and 40 nm gold colloid

(2) Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP003, U.S.A.)을 5mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체를 10mg/ml을 2.0 μ l씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 ICA를 실시한다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료의 준비는 ELISA의 경우와 동일하게 수행하였다.

시작품제작은 미국부저의 경우와 마찬가지로 국내 유수의 진단액 제조사인 바이오노트에 발주하여 제작하였다.

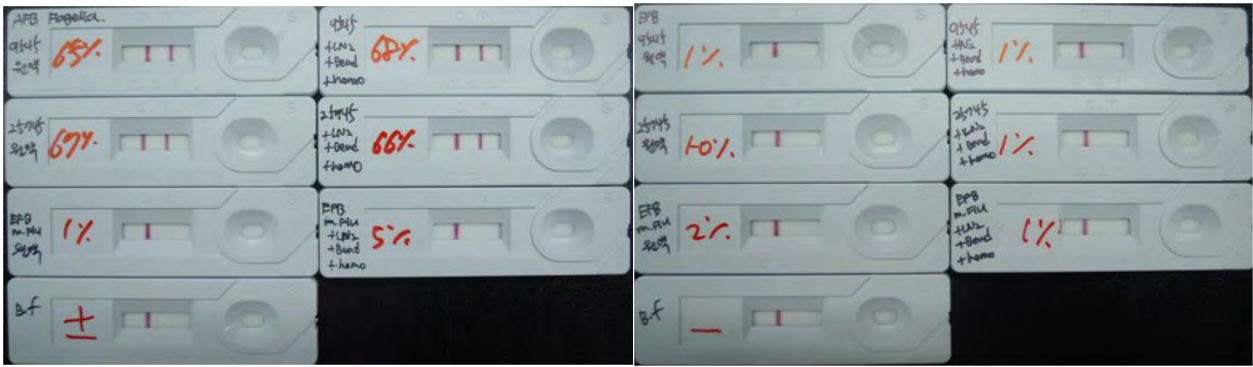


Figure 10. 유럽부저 진단용 Immunochromatography 시약으로 검사한 결과물

(3) ICA의 민감도 및 특이도

ICA의 민감도 및 특이도의 비교는 PCR에 의한 결과(이 등, 2004)를 기준으로 비교하여 보았을 때, 민감도는 92.0%, 특이도는 100%를 보였다 (Table 7).

Table 7. The result of comparison PCR and Rapid kit

Rapid kit	PCR (Ref. method)		Total
	Positive	Negative	
Positive	46	0	46
Negative	4	54	58
Total	50	54	

가. Sensitivity: $46/(50)*100= 92.0\%$, 나. Specificity: $54/(54+0)*100= 100\%$

본 연구는 현재 제2종가축전염병으로 지정되어 있을 만큼 양봉농가에 많은 피해를 주고 있는 *P. larvae*에 의해 발병하는 세균성질병인 미국부저병 및 유럽부저병의 신속한 조기 진단 및 현장에서 신속한 진단을 위해 필요한 ELISA와 ICA를 개발하기 위하여 수행되었다. 꿀벌 질병의 정확하고 신속한 진단은 질병제어에 의해 생산성을 향상시킨다. 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae* subsp. *larvae*의 검출을 위한 PCR-kit가 개발, 생산되고 있으며 (양과 윤, 2001), 2001년 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae*에서 비병원성 아종인 *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*가 발견됨에 따라 비병원성 균을 제외한 *P. larvae* subsp. *larvae*만을 검출해 낼 수 있는 Real-Time PCR기법이 개발되었다 (이 등 2004).

또한 미국부저병의 진단을 위한 항체 개발도 시도된 바 있으나 (백 등, 2002), 이는 polyclonal antibody로서 특이도에 문제점이 있을 것으로 사료되며, 검색키트의 제품 안정화를

위해 본 연구에서 실시한 단클론항체의 개발과 이를 이용한 ELISA kit의 개발은 특이성을 높이는 중요한 의미를 줄 수 있다고 사료된다. 본 연구에서는 단클론항체를 정제, 이용하여 ELISA 법을 개발하여 특이도를 높였으며, 이러한 단클론항체를 ICA를 이용하여 진단의 정확성을 높일 수 있게 되었다. 이러한 kit의 개발 과정에서 먼저 아포의 생산을 유도하기 위해 AK 배지에서 5일간 배양 하였을 경우 kit를 생산하기 위한 *P. larvae*의 충분한 아포 형성이 확인되었으며, 정제된 단클론항체는 *P. larvae* 와 특이적으로 반응하였다. 또한 이러한 단클론항체는 *P. larvae*를 제외한 다른 균들과 교차반응을 나타내지 않는 것으로 보아 특이도가 높은 것으로 확인되었다. *P. larvae* 진단용 ELISA의 검출한계는 10^5 spore/100 μ l 이었으며, 이는 100 μ l의 시료량으로 고려할 때 1×10^4 까지 검출이 가능한 성적이며, 추가적인 최적화를 실시한다면 산업화를 위한 kit 개발이 가능할 것으로 사료된다. 이러한 검출한계를 기준으로 기존에 개발되어 있는 PCR 기법(이 등, 2004)을 기준으로 비교하였을 경우, 민감도는 96.0%, 특이도는 100% 이었다. 또한 ICA의 개발을 위해 colloidal gold를 전자현미경으로 확인하였을 때 20nm 및 40nm 구경의 입자가 확인되었고, 제조된 colloidal gold 부유액은 현장적용 측정방법으로서 ICA의 gold-Ab 접합체로 사용이 적합한 것으로 사료된다. 이를 바탕으로 ICA의 검출한계는 10^7 spore/100 μ l 이었으며, 역시 PCR 기법과 비교하였을 경우, 민감도는 92.0%이고, 특이도는 100% 이었다. 이는 PCR 기법에 못지않게 민감도 및 특이도가 뛰어나며, 다수의 샘플을 위한 검사나, 특별한 기기의 필요 없이 현장에서의 신속한 진단을 위해 ELISA 기법과 Rapid kit의 개발은 쉽고 빠르게 *P. larvae* subsp. *larvae*를 진단하여 양봉농가의 경제적 손실은 최소화할 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 절 노제마병 검색을 위한 신규 검출법의 개발

1. Nosema병의 원인균 *Nosema cerana*에 대한 LAMP 신규검출법의 개발

가. 서론.

본 연구는 노제마병(Nosema disease)의 원인체인 진균(일부 원생동물로 분류됨), *Nosema cerana*를 정확히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, 이 병원체는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)이 아닌, 동양종 꿀벌(*Apis cerana*)에서 그 감염이 먼저 발견되었기에, 기존의 노제마병의 병원체, 즉 *Nosema apis*와 다른 이름으로 명명되었다. 근래 *Nosema cerana*에 의한 감염은 기존의 병원체인 *Nosema apis*에 비하여 그 피해정도가 더욱 심각한 것으로 알려지게 되었으며, 이런 이유로 *Nosema cerana*를 *Nosema apis*와 구별되게 검색하여야 하는 상황을 초래하였다. 본 내용은 한국양봉학회지 25(4), 2010년 12월에 발표된 것이다.

꿀벌 노제마병(Nosema disease)은 편성 세포기생충(obligate intracellular parasites)인 *Nosema apis*(*N. Apis*)와 *Nosema ceranae*(*N. Ceranase*)에 의하여 야기되는 질병으로(Fries *et al.*, 1996) 전 세계적으로 유행하고 있으며, 일벌의 활동 둔화, 수명 단축과 봉군의 약화와 막대한 경제적 손실을 초래한다(Fries *et al.*, 1984; Anderson and Giaccon, 1992).

*N. Apis*는 백여 년전부터 서양종 꿀벌에게 노제마병을 일으킨다고 알려져 왔으며(Mariano *et al.*, 2007), *N. Ceranae*는 최근에 같은 숙주에서 노제마병을 야기하는 진균으로 보고되었다(Huang *et al.*, 2005; Higes *et al.*, 2006). *N. Ceranae*는 1994년 중국에서 아시아 꿀벌종인 *Apis cerana*로부터 처음 진단되었으며(Fries *et al.*, 1996), *N. apis*와 형태적인 특징은 유사하나(Fries *et al.*, 2006; Larsson, 1986; Weiss and Vossbrinck, 1999), 16S small subunit (SSU) rRNA 유전자의 염기서열과 초미세구조적 특징에 의하여 명확히 구분된다(Fries *et al.*, 1996). Mariano 등의 연구에 따르면 서양종 꿀벌에 대하여 *N. Ceranae*가 *N. Apis*보다 높은 병원성을 나타낸다.

현재까지 개발된 노제마 질병 진단법으로 PCR 과 Real-time PCR 을 이용하는 방법이 있으나 이 두 방법은 실험실적 방법으로 시료 채취 후 실험실로 운반하여 검사 하기까지 오랜 시간이 걸려 시료의 손상을 막기 어렵다. 또한 2-3 시간동안 PCR 을 수행하기 때문에 검사 결과를 받기까지 오래걸릴 뿐만 아니라, PCR 과정에서 요구되는 온도변화에 의해 시료가 변형될 가능성도 있다. 그리고 고가의 장비를 사용하기 때문에 현장에 적용하기 어렵다. 반면에 2000 년도에 개발된 Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법은 등온에서 1시간이내에 DNA 신장이 가능한 방법으로 고가의 장비인 thermocycler 없이 간단한 항온기만으로 실험이

가능하다(Tsugunori et al., 2000). 또한 6 개의 독립된 자리를 인식하기 때문에 높은 특이성을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 LAMP 법을 이용한 *N. Ceranae* 의 검출법을 개발하고 이 실험법을 최적화하여 양봉현장에서 실제로 적용가능한가를 검토하고자 하였으며, 또한 현장적용 가능성을 높이기 위해 SybrGreen 을 사용하여 육안으로 확인할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) *N. ceranae*-specific LAMP 법의 primer 설계 및 제작

N. ceranae-specific LAMP 에 사용된 primer 는 Table 1에 나타내었다. LAMP forward primer 인 Nosema-FIP 는 *N. ceranae* anti-sense sequence 의 상보적인 염기서열(F2)과 TTTT linker 그리고 loop 를 형성하는 sequence (F1c)의 부분을 합한 것으로 45 nt 의 long-nucleotide 로 제작 되었다. Reverse primer 인 Nosema-BIP은 *N. ceranae* anti-sense sequence 의 상보적인 염기서열(B2)과 TTTT linker, loop 를 형성하는 sequence (B1c)의 부분을 합한 것으로 48 nt 의 long-nucleotide 로 제작 되었다. 또한 Nosema-F3 와 Nosema-B3 는 각각 inner primer의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각각 25 nt, 19 nt 의 크기로 제작 하였다. 이 primer 들은 Bionics 사(Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 inner primer 의 경우에는 PAGE 정제 후 사용하였다(Table 1, 그림 1).

Table 1. Primers of *N. ceranae*-specific LAMP

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
Nosema-F3	CTACGTTAAAGTGTAGATAAGATGT	25
Nosema-B3	TCCCATAACTGCCTCAGAT	19
Nosema-FIP ¹⁾	ACCCGTCACAGCCTTGTTAA-TTTT-GTAAGAGT GAGACCTATCAGC	45
Nosema-BIP ²⁾	ACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAG-TTTT-CCA TAGGTCAAGTTTCGCC	48

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

5'-TAGACGCTATTCCTAAGATTAACCCATGCATGTTTTTGACATTTGAAAAATGGA
 CTGCTCAGTAATACTCACTTTATTTTATGTAAATTTTAAATTAACACTACGTAAAGTG
 TAGATAAGATGTTTACAGTAAGAGTGAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGC
 TTAACAAGGCTGTGACGGGTAACGGTATTACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCCT
 GAGAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACTTGACCTATGGATT
 TTATCTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATTATATTGTTTCATATTTTAAAAGTATAT
 GAGGTGATTAATTGGAGGGCAAATCAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTC-3'

Figure 1. Nucleotide sequences and location of primers for *N. ceranae*-specific LAMP

(2) *N. ceranae*-specific LAMP 의 반응액 조성과 최적 등은 온도의 측정

pBX-Nosema 의 특이적 검출을 위하여, primer 와 *Bst* DNA polymerase 의 활성을 위한 최적 온도를 측정하고자 하였다. 반응액은 주형인 pBX-Nosema plasmid (유 등, 2008) 1 ng, inner primer 인 Nosema-FIP/BIP 는 각각 40 pmole, outer primer 인 Nosema-F3/B3 은 각각 10 pmole, 2.5 mM 의 dNTP, 10×Reaction buffer, 8 U 의 *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A)를 첨가하여 총 25 μ l 로 조성하였다. *Bst* DNA polymerase 의 경우 80°C 이상이 되면 불활성화 되기 때문에, 94°C에서 5분간 DNA를 해리시킨 뒤 바로 얼음으로 옮겨 온도를 내린 뒤 첨가하였다. 이 후 60분간 DNA 신장을 진행하였고, 80°C에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. DNA 신장의 최적온도 측정은 각각 52.5°C, 54.2°C, 56.4°C, 58.9°C, 61.0°C 에서 1시간 동안 등온조건하에서 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하여 *N. ceranae*-specific LAMP에 대한 최적온도를 측정하였다.

(3) *N. ceranae*-specific LAMP 의 최적 반응액 조성

N. ceranae-specific LAMP 의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 여러 가지 조성 성분에 대한 최적 조건을 확인하였다. primer 의 농도는 Notomi (2000)이 제시한 outer primer 와 inner primer 의 농도가 1:4 일 때 가장 높은 효율을 보였다는 결과를 바탕으로 이 비율을 유지하되 primer 의 절대농도만을 변화시켜 그 결과를 측정하였다. 즉, inner primer 의 각 농도를 5 pmole, 10 pmole, 20 pmole, 40 pmole, 60 pmole 로 하여 LAMP를 수행하였으며 이 때 outer primer 의 각 농도는 1.25 pmole, 2.5 pmole, 5 pmole, 10 pmole, 15pmole 로 맞추었다.

또한 dNTP의 농도는 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM 로 조성하여 측정하였으며, *Bst* DNA polymerase의 농도는 4 U, 8 U, 16 U, 24 U, 32 U, 40 U 으로 조성하여 측정함

으로써 최적 반응 조건을 확립하였다.

(4) *N. ceranae*-specific LAMP 에서 primer 의 검출한계

N. ceranae 의 검출에 있어 *N. ceranae*-specific LAMP 의 검출한계를 측정하기 위하여 pBX-Nosema plasmid 의 copy 수를 아래의 식에 따라 계산하여 1×10^8 copies 부터 1/100 씩 단계희석한 후, 이를 주형으로 하여 확립된 최적조건에서 LAMP 를 수행하였다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration} (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g/mol})} = \text{amount} (\text{copies}/\mu\text{l})$$

(5) *N. ceranae* 감염 꿀벌시료에서 *N. ceranae*-specific LAMP 에 의한 *N. ceranae* 의 검출

N. ceranae-specific LAMP 법이 양봉현장에서 적용될 수 있는가를 확인하기 위하여 Nosema 특이 Real-time PCR (유 등, 2008)에 의하여 Nosema 감염꿀벌로 확인된 시료 중 보관된 냉동시료들을 해동하여 RT-reaction 후 *N. ceranae*-specific LAMP 와 Nosema 특이 Real-time PCR 을 동시 수행하였다. 대조군으로는 pBX-Nosema (1×10^8 copies)를 주형으로 사용하였고, LAMP 실험은 확립된 최적조건에서 수행하였다.

(6) SybrGreen test

DNA 이중 가닥에 삽입되어 자외선상에서 녹색의 형광을 발현하는 1×SybrGreen 를 사용하였으며, 이 혼합물을 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) *N. ceranae*-specific LAMP 의 반응액 조성과 최적 등은 온도의 측정

N. ceranae-specific LAMP 의 최적 등은 온도를 측정하기 위하여 52.5°C, 54.2°C, 56.4°C, 58.9°C, 61.0°C 에서 1시간 동안 각기 등은조건하에서 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하였다.

N. ceranae-specific LAMP 는 52.5-61.0°C 의 범위에서 *N. ceranae*-specific DNA 가 무난히 신장되는 것을 확인하였으며, 신장된 DNA 는 추론된 100 bp의 산물부터 loading well 까지 다양한 크기로 나타났다(그림 2).

N. ceranae-specific LAMP에 최적의 온도범위는 반복실험을 통하여 56.4℃ 로 측정되었으며, 이후의 실험은 이 온도에서 수행하였다.

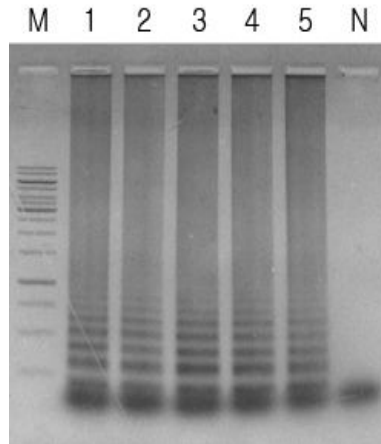


Fig. 2. Temperature gradient *N. ceranae* - specific LAMP

Lane M is 1kb ladder Marker(Fermentas). Lane 1 to 5 were specific LAMP product from each LAMP under isothermal temperature at 52.5℃, 54.2℃, 56.4℃, 58.9℃ and 61.0℃, respectively. Lane N is without template. Optimal elongation temperature was determined at 56.4℃.

(2) *N. ceranae*-specific LAMP 의 최적 반응액 조성

N. ceranae-specific LAMP 의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP, *Bst* DNA polymerase 의 최적 농도를 구하였다.

primer 의 경우 inner primer 가 각각 20 pmole, outer primer 가 각각 5 pmole 일 때 가장 많은 LAMP 생성물이 형성되었으며(그림 3-A), inner primer가 각각 5 pmole, outer primer가 각각 1.25 pmole 일 때는 LAMP 생성물이 생기지 않았다. 이를 바탕으로 반복실험을 하여 primer 의 최적농도를 inner primer의 경우에는 20 pmole, outer primer 의 경우에는 5 pmole 로 결정하였다.

한편, *N. ceranae*-specific LAMP 에서 dNTP의 최적 농도를 확립하기 위하여 각 반응액에 1.25 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM 의 dNTP 를 첨가하여 LAMP 를 수행하고 그 생성물의 양을 전기영동을 통하여 비교하였다(그림 3-B). 그 결과 dNTP의 양이 5 mM 일

때, loading well 까지 DNA의 신장이 잘 이루어졌으며, 7.5 mM 이상일 경우에는 loading well 까지 DNA 가 신장되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 미량의 특이 DNA를 검출하고자 하는 본 연구에서 *Bst* DNA polymerase 가 반응시간동안 긴 DNA 까지 다양하게 합성해 낼 수 있는 점은 실험 결과의 판정에 매우 중요한 것이라 판단되며, 이를 통하여 과량의 dNTP 는 LAMP의 반응을 저해한다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 반복실험을 통하여 연속적 합성과정 이 중단되지 않는 반응조건을 고려하여 *N. ceranae*-specific LAMP 에서 dNTP의 최적 농도를 5 mM 로 결정하였다.

Bst DNA polymerase의 경우 각각 4 U, 8 U, 16 U, 24 U, 32 U, 40 U 을 첨가하여 LAMP 를 수행하였다. 4 U 과 8 U 을 첨가한 경우에는 loading well 까지 DNA 가 신장되었으나 16 U 이상에서는 loading well 까지 DNA 가 신장되지 않았다. 4 U 을 첨가하였을 때 다양한 크기와 많은 생성물이 확인되어 *Bst* DNA polymerase 의 최적농도를 4 U 로 판정하였다(그림 3-C).

따라서 *N. ceranae*-specific LAMP 를 위한 최적 반응액의 조성은 총 25 μ l 의 반응액을 조성하는 것을 기준으로, 각각 20 pmole 의 inner primer, 각각 5 pmole 의 outer primer, 5 mM 의 dNTP, 10 \times Reaction buffer, 4 U 의 *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A)로 결정하였으며, 56.4 $^{\circ}$ C 의 등온조건에서 60분간 수행하는 것을 *N. ceranae*-specific LAMP 의 표준조건으로 결정하였다.

(3) *N. ceranae*-specific LAMP 에서 primer 의 검출한계

N. ceranae 에 대한 *N. ceranae*-specific LAMP 의 검출한계를 특정하기 위하여 pBX-Nosema plasmid 를 1 \times 10⁸ copies 부터 1 \times 10⁰ copy 까지 1/100 씩 단계별로 희석한 후 주형으로 사용하였다.

검출한계 측정 결과 1 \times 10² copies 의 pBX-Nosema plasmid 를 사용한 LAMP 증폭산물까지 전기영동으로 확인할 수 있었다(그림 4).

(4) *N. ceranae* 감염 꿀벌시료에서 *N. ceranae*-specific LAMP 에 의한 *N. ceranae* 의 검출

N. ceranae-specific LAMP 이 실제 *N. ceranae* 감염 꿀벌 검체에 대하여 적용 가능한지를 알아보기 위하여 Nosema 특이 Real-time PCR 에 의하여 감염이 확인된 꿀벌과 감염되지 않은 꿀벌을 대상으로 검사를 수행하였다. 대조군으로는 pBX-Nosema (1 \times 10⁸ copies)를 사용하였다.

실제 *N. ceranae* 에 감염된 꿀벌 시료에서는 *N. ceranae*-specific LAMP 에 의하여

pBX-Nosema plasmid 의 경우와 같이 특징적인 LAMP 생성물이 형성되는 것을 확인할 수 있었으며, *N. ceranae* 에 감염되지 않은 꿀벌 시료를 사용한 *N. ceranae*-specific LAMP 에서는 LAMP 생성물이 형성되지 않았다(그림 5). 본 실험은 실제 감염된 꿀벌 시료에 대하여 검출 가능성을 보여주었다.

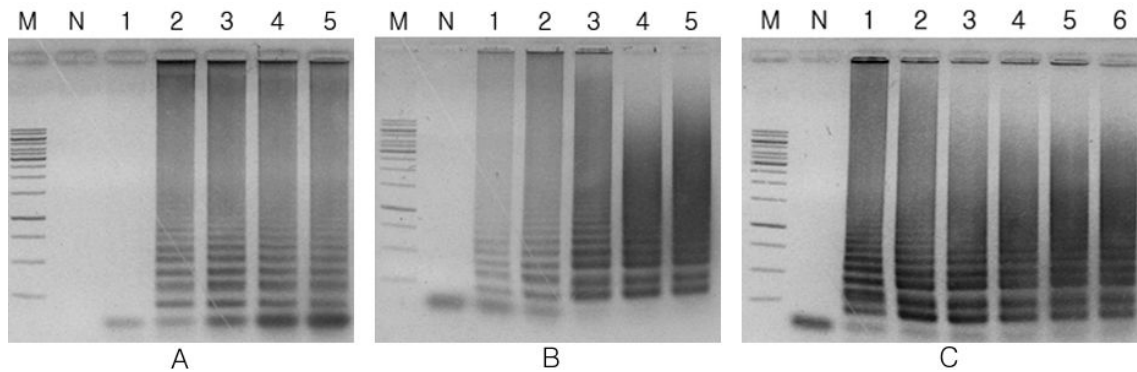


Figure 3. The optimal concentration of reaction solutions in *N. ceranae* - specific LAMP.

Panel A. The optimal concentration of primers. Lane M is 1Kb ladder marker (Fermentas). Lane N, 0pmole Nosema-FIP/BIP and 0pmole Nosema-F3/B3; Lane 1, *N. ceranae* - specific LAMP using 5pmole Nosema-FIP/BIP and 1.25pmole Nosema-F3/B3; Lane 2, *N. ceranae* - specific LAMP using 10pmole Nosema-FIP/BIP and 2.5pmole Nosema-F3/B3; Lane 3, *N. ceranae* - specific LAMP using 20pmole Nosema-FIP/BIP and 5pmole Nosema-F3/B3; Lane 4, *N. ceranae* - specific LAMP using 40pmole Nosema-FIP/BIP and 10pmole Nosema-F3/B3; Lane 5, *N. ceranae* - specific LAMP using 60pmole Nosema-FIP/BIP and 15pmole Nosema-F3/B3.

Panel B. The optimal concentrations of dNTP. Lane M is 1Kb ladder marker (Fermentas). Lane N is negative control. Lane 1 to 5, LAMP products using 1.25 mM; 2.5 mM; 5 mM; 7.5 mM; 10 mM dNTP. The optimal concentration of dNTP was determined at 5mM.

Panel C. The optimal concentration of Bst DNA polymerase. Lane M is 1Kb ladder marker (Fermentas). Lane N is negative control. Lane 1 to 6, LAMP products using 4U; 8U; 16U; 24U; 32U; 40U Bst DNA polymerase. The optimal concentration of Bst DNA polymerase was determined at 4U.

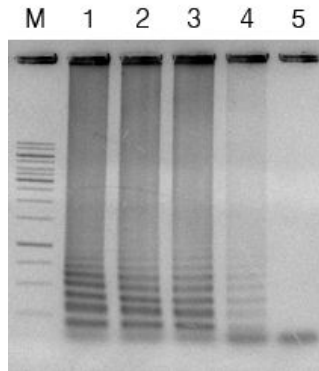


Figure 4. Sensitivity test of primers in *N. ceranae*-specific LAMP. Detection limit of *N. ceranae*-specific LAMP. pBX-Nosema solution containing 1×10^8 copeis/ μl was serially 100-fold diluted. Lane M is 1Kb ladder marker(Fermentas). Lane 1, *N. ceranae*-specific LAMP with using 1×10^8 copeis/ μl . Lane 2, *N. ceranae*-specific LAMP with using 1×10^6 copeis/ μl . Lane 3, *N. ceranae*-specific LAMP with using 1×10^4 copeis/ μl . Lane 4, *N. ceranae*-specific LAMP with using 1×10^2 copeis/ μl . Lane 5, Nosema-specific LAMP with using 1×10^0 copy/ μl .

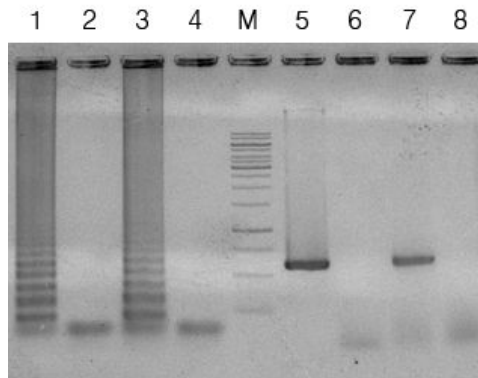


Figure 5. Application of *N. ceranae*-specific LAMP to infected honey bee samples.

Lane M is 1Kb ladder marker(Fermentas). Lane 1 and 5 are using pBX-Nosema plasmid (1ng). Lane 2 and 6 is without template. Lane 3 and 7 are using honey bee sample by infected Nosema disease. Lane 4 and 8 are using honey bee sample by not infected Nosema disease. Lane 1-4 is reaction product by *N. ceranae*-specific LAMP. Lane 5-8 is reaction product by *N. ceranae*-specific Real-time PCR.

(5) SybrGreen test

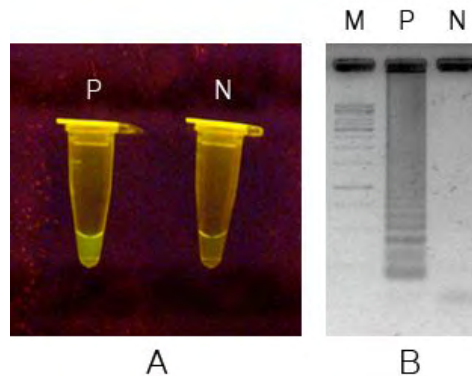


Figure 6. SybrGreen test of *N. ceranae*-specific LAMP.

Panel A. LAMP product (P) and negative control (N) and were stained by SybrGreen. Each products were observed by ultraviolet transilluminator.

Panel B. Each products observed by ultraviolet transilluminator were analyzed by gel electrophoresis. Lane M is 1Kb ladder marker(Fermentas). Lane P is LAMP product on pBX-Nosema plasmid. Lane N is negative control.

신장된 *N. ceranae*-specific LAMP 생성물에 1×SybrGreen 를 첨가시킨 뒤, 이 혼합물을 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하여 녹색형광을 확인하였다(그림 6). 대조군에서도 녹색형광이 나타나긴 하였으나 그 정도가 LAMP 생성물에 비하여 약한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 SybrGreen을 이용한 *N. ceranae*-specific LAMP 의 생성물 확인은 대조군과 함께 관찰했을 때 확인가능하다.

본 연구에서 개발된 *N. ceranae*-specific LAMP 는 *N. ceranae* 의 16S small subunit (SSU) rRNA (GenBank, DQ486027)를 target으로 하여 설계되었다. 등온에서 1시간 이내에 *N. ceranae*-specific DNA 를 선택적으로 신장시키는 *N. ceranae*-specific LAMP 는 높은 특이성을 가지며, 다른 바이러스에

반응하지 않음을 보여주었다. 또한 고가의 장비인 thermocycler 없이 항온기만으로도 실험수행이 가능하고 SybrGreen 시약을 이용하여 ultraviolet trans illuminator 상에서 맨눈으로 DNA 신장 확인여부를 확인할 수 있어 현장에서 바로 적용가능하기 때문에 매우 유용할 것으로 생각된다.

라. 적요

노제마병(Nosema disease)은 편성 세포기생충(obligate intracellular parasites)인 *Nosema apis*(*N. Apis*) 와 *Nosema ceranae*(*N. Ceranase*) 에 의하여 야기되는 질병이다. 최근에 *N. Ceranase* 는 *Apis cerana* 뿐만 아니라 *Apis mellifera* 에서도 종종 발견된다. *N. Ceranase* 는 *N. apis* 보다 병원성과 독성이 강하다고 알려져 있다.

본 연구에서는 *N. ceranae* 를 특이적으로 검출하는 LAMP 법을 개발하였다. *N. ceranae* small subunit ribosomal RNA gene (GenBank, DQ486027)을 바탕으로 *N. ceranae* 특이 primer 4 개(*Nosema*-F3/B3/FIP/BIP)를 설계하였다. pBX-*Nosema* plasmid 를 주형으로 하여 *N. ceranae*-specific LAMP 는 56.4°C 에서 성공적으로 *N. ceranae* 특이 DNA 가 신장되었다. 또한 *Nosema* 특이 Real-time PCR 에 의하여 감염이 확인된 꿀벌 시료는 *N. ceranae*-specific LAMP 에 의하여 다시 확인하였다.

N. ceranae-specific LAMP 는 현장에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되며, *N. ceranae* 에 의한 자연적인 감염도 모니터링 할 수 있을 것으로 기대된다.

2. Nosema병의 원인균 *Nosema ceranae*에 대한 초고속 PCR 신규검출법의 개발

가. 서론.

본 연구는 노제마병(Nosema disease)의 원인체인 진균(일부 원생동물로 분류됨), *Nosema ceranae*를 가장 빠르게 검출하고자 하는 목적으로, 초고속 PCR법(Ultra-rapid PCR)을 적용하여 신규 개발한 것이다. 총 30회전의 PCR검출을 12분에 마칠 수 있었으며, 검체의 양/음성의 판정은 10분이내에 가능하였다. 본 내용은 Journal of Apiculture 26(1), 2011년 4월에 “Development of Ultra-rapid Real-Time PCR Method for the detection of Nosema ”의 제목으로 발표된 것이다. 본 보고에서는 그 결과를 중심으로 발췌하여 전제한다.

나. 재료 및 방법.

Table 1. Primers of Nosema-specific for ultra-rapid real-time PCR

Gene	Primer name	Primer sequence(5'→3')	PCR Product (bp)	Reference
<i>Nosema ceranae</i>	Nosema-180-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	180	Yoo et al., 2008
	Nosema-180-R	AGCTTTCGCTTCTGTTTCGTC		
	Nosema-230-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	230	This study
	Nosema-230-R	CTTCGATCCTCCAGCTTACG		

다. 결과 및 고찰.

(1) 초고속 PCR을 위한 Primer쌍의 선발

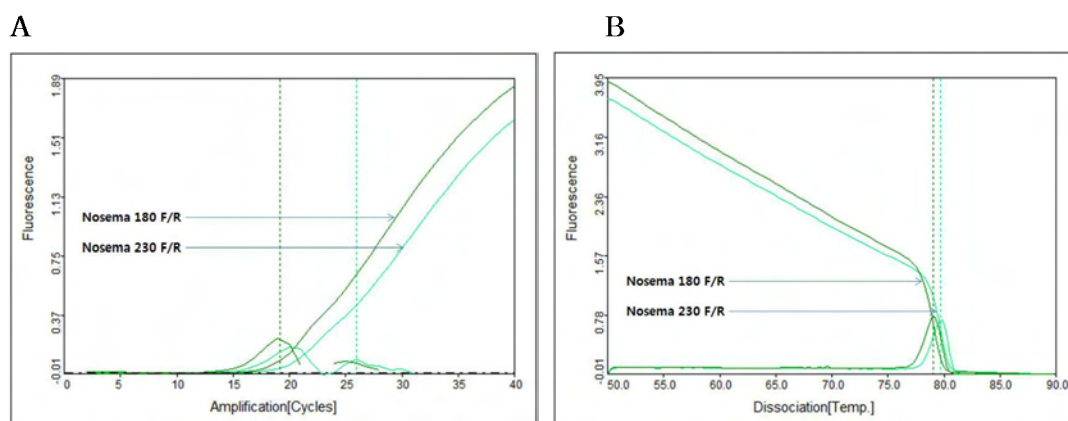


Figure 1. The primer selection for ultra-rapid real-time PCR. Panel A shows fluorescence

curves of URRT PCRs with Nosema-180-F/R and Nosema-230-F/R primer sets. The highest specific and sensitive primer set was evaluated. Panel B shows the result of melting analysis of the same PCR products in the range of 50–90°C. All PCR products were identical, dependent on the temperature of midpoint (T_m). Nosema-180-F/R show the fastest C_T value (19.13).

(2) Nosema 초고속 PCR을 위한 조건의 최적화

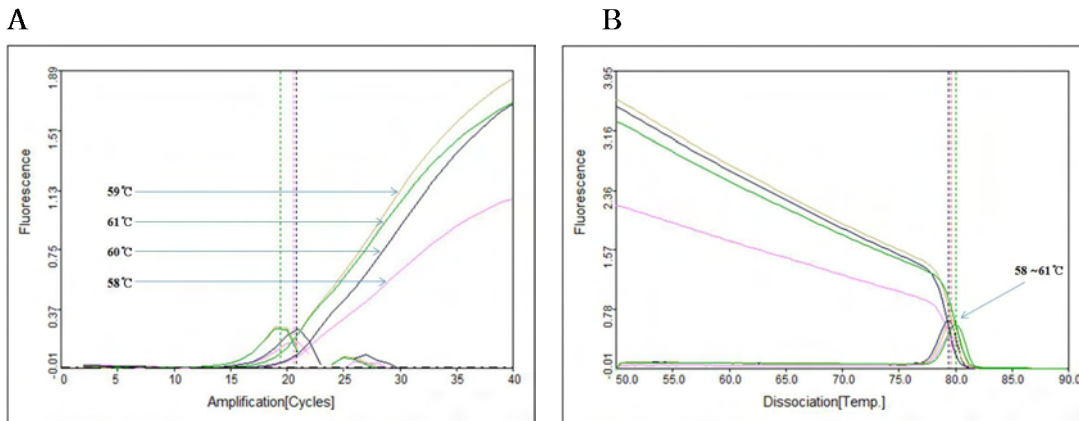


Figure 2. Optimal annealing temperature of specific PCR using Nosema-180-F/Nosema-180-R primers pairs. PCR was performed under the following conditions: 94°C, 100sec pre-denaturation/ 94°C, 10sec; 58–61°C, 10sec; 72°C, 10sec; 40cycles/ 50–90°C melting temperature analysis. Panel A shows fluorescence curves of gradient URRT PCRs. Panel B shows the result of melting analysis of the same PCR products in the range of 50–90°C. All PCR products were identical, dependent on the temperature of midpoint (T_m), calculated in range of 79.29~79.97°C. The detection primer pairs show the fastest C_T value at 59°C.

(3) Nosema 초고속 PCR의 민감도

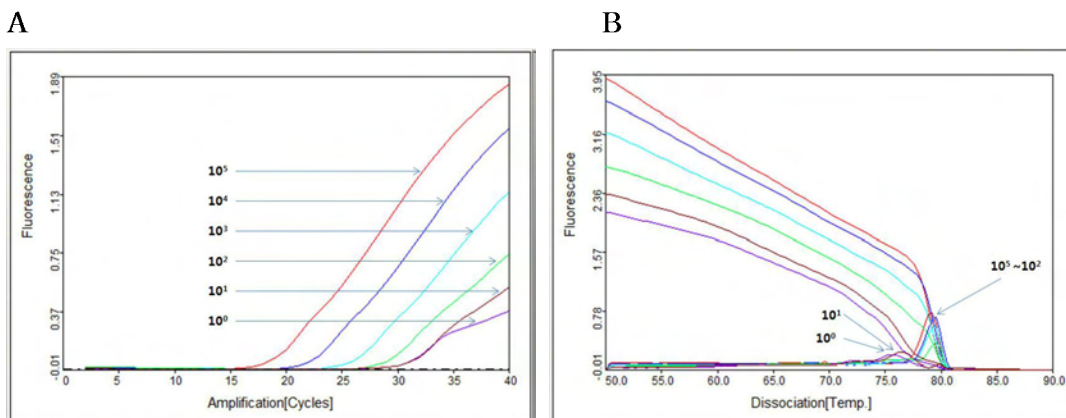


Figure 3. Test of the sensitivity of the detection primer set with serially diluted pBX-Nosema. Each URRT PCR was performed under standard conditions with different

quantities of initial template DNA. Initial templates were used in the range of 10^5 to 10^0 copies of pBX-Nosema, respectively. The C_T values showed the initial quantity of template-dependent manner in the range of 10^5 - 10^2 copies. Panel A shows fluorescence intensity curves of template limit diluted URRT PCRs. Panel B shows the result of melting analysis of the same PCR products in the range of 50-90°C. All PCR products were identical, and dependent on the temperature of midpoint (T_m) calculated in range of 79.01 ~ 79.43°C.

(4) 기질의 농도에 따른 Nosema 초고속 PCR의 검출시간 변화

Table 2. Nosema ultra-rapid real-time values of C_T and T_m in range of 10^5 - 10^0 copies

Initial template	Elapsed time	C_T value	T_m value
10^5 copies of pBX-Nosema	37:12	19.13	79.01
10^4 copies of pBX-Nosema	37:06	22.62	79.37
10^3 copies of pBX-Nosema	36:56	26.46	79.32
10^2 copies of pBX-Nosema	36:57	29.48	79.43
10^1 copies of pBX-Nosema	36:53	31.06	79.43/75.53
10^0 copies of pBX-Nosema	36:47	31.68	79.81/76.47

(5) Nosema 감염시료를 사용한 Nosema 초고속 PCR의 정량성

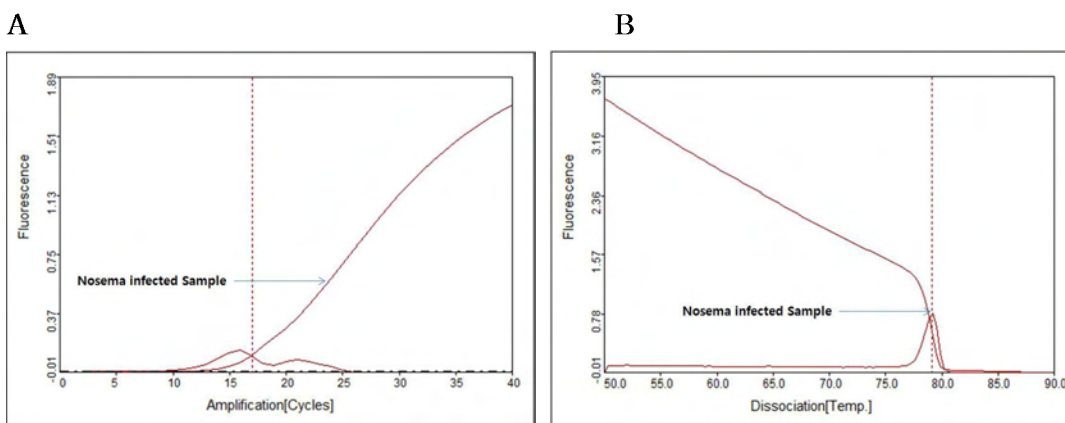


Figure 4. Nosema detection using ultra-rapid real-time PCR in genomic DNA from Nosema-infected honeybee samples.

Confirmed PCR conditions were applied to Nosema-URRT PCR using genomic DNA from Nosema-infected honeybee samples.

(6) Nosema 검출을 위한 Nosema 초고속 PCR의 최소시간

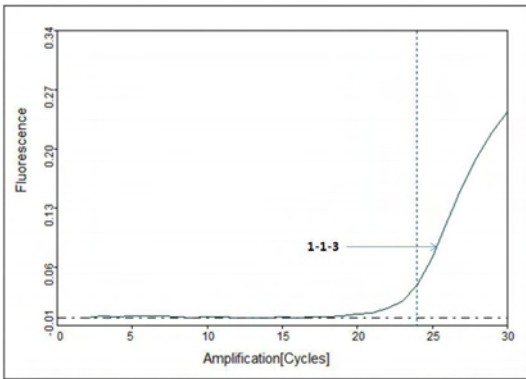


Figure 5. Minimal detection time confirmation using Nosema-infected DNA in URRT PCR. Each reaction was performed in following condition: 94°C for 1s, 59°C for 1s, 72°C for 3s. The confirmed detection time was 12min 19sec.

제 4 절 백목병 검색을 위한 LAMP 신규 검출법의 개발

1. LAMP법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheera apis*의 검출법 개발

가. 서론

꿀벌의 진균성 질병으로 알려져 있는 백목병(Chalk brood disease)의 원인균은 *Ascospheera apis* (*A. apis*)으로 한 종류의 strain(+ 또는 -)만 소방내의 유충에 침입한 경우에는 백색의 미이라로, 균사가 함께 침입한 경우에는 흑색의 미이라 형태가 되어 백목같이 딱딱하게 되어 죽는다(Maassen, 1913; Deans, 1940; De Jong, 1977; Bailey, 1981).

*A. apis*는 포자의 형태로 감염되며 꿀벌 유충의 경구로 침입하여 중장관에서 부화하고, 부화된 포자는 균사형태로 자라 유충의 체액을 마르게 함으로써 치사시킨다. 특히 숫벌의 유충에 감수성이 높고 포자는 10-15년까지 병원성을 유지할 정도로 생존력이 강하다(Maurizio, 1934; Bailey, 1981; Heath and Gaze, 1987; 윤, 2001a).

백목병은 일반 양봉인에게 세균성 질병에 비하여 보다 적은 피해를 주는 질병으로 인식되어져 왔으나 윤 등(2001b)의 보고에 의하면 백목병은 강원도지방의 양봉농가에서 가장 심각하게 인식된 꿀벌의 질병으로 조사된 바 있으며, 광범위하게 적지 아니한 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 또한 많은 경우 백목병에 감염된 유충은 노제마병, 바이러스 질환에 혼합감염 될 위험성이 매우 높으며, 혼합감염은 보다 심각한 결과를 초래하게 된다(윤 등, 2001b).

현재까지 개발된 백목병 진단법으로 PCR (이 등, 2004), real-time PCR (이 등, 2005) 및 quick real-time PCR (ultra-rapid real-time PCR) (이 등, 2006)을 이용하는 방법이 있으나 이 방법들은 실험실적인 방법으로 시료 채취 후 실험실로 운반하여 검사하기까지 오랜 시간이 걸려 시료의 손상을 막기 어려울 뿐만 아니라 PCR 과정에서 요구되는 온도변화에 의해 시료가 변형될 가능성이 있다. 또한 고가의 장비를 사용하기 때문에 현장에 적용하기 어렵다. 반면에 2000년도에 개발된 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법은 등온에서 1시간 이내에 DNA 신장이 가능한 방법으로 고가의 장비인 thermocycler 없이 간단한 항온기만으로 실험이 가능하다(Notomi *et al.*, 2000). 또한 6개의 독립된 자리를 인식하기 때문에 보다 높은 특이성을 가지고 있다(Fig. 1).

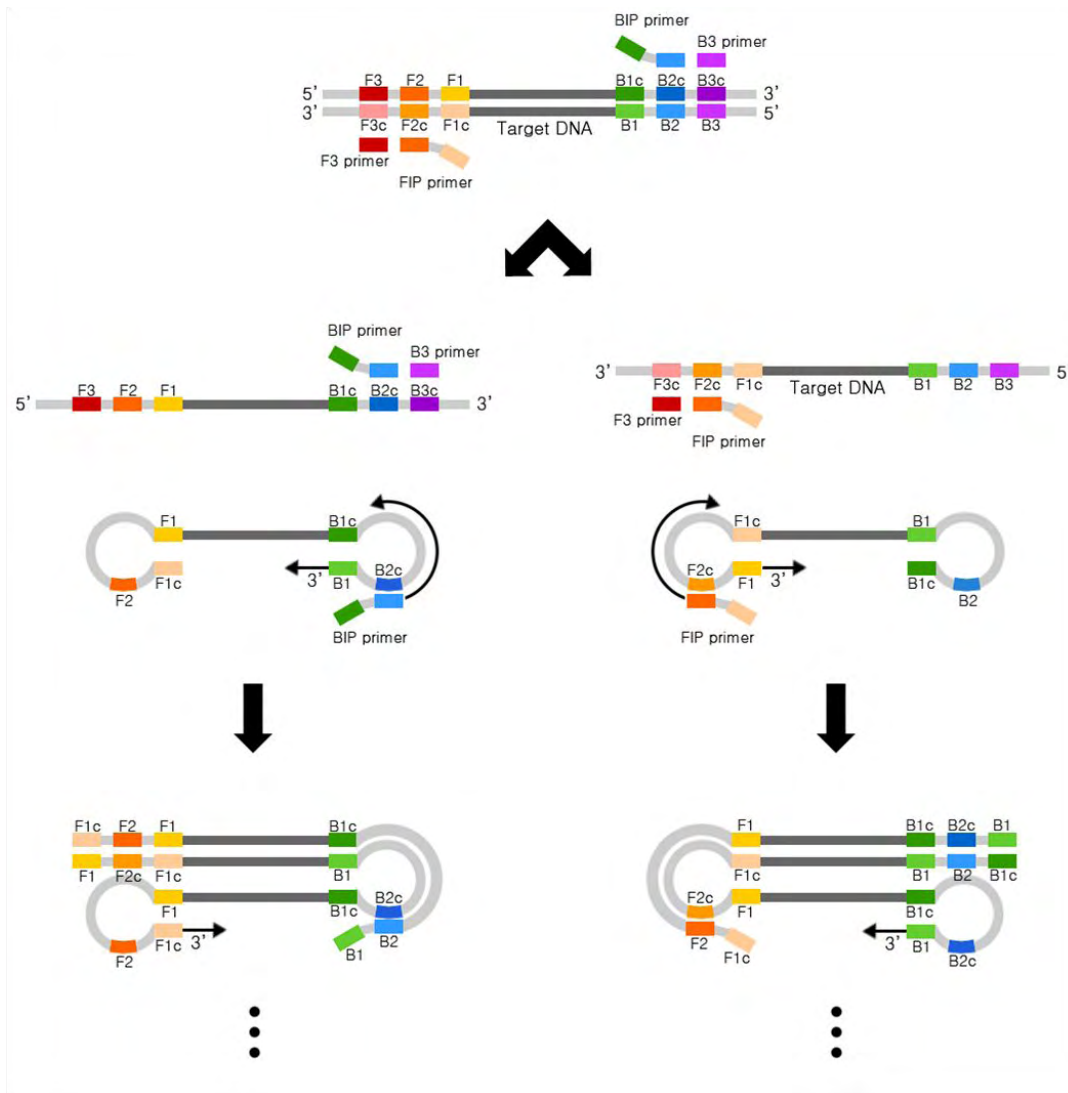


Fig. 1. Schematic representation of the mechanism of LAMP. Steps in the LAMP reaction. This figure shows the process that starts from primer FIP. It should be remembered that DNA synthesis can also begin from primer BIP.

따라서 본 연구에서는 LAMP법을 이용하여 백목병 원인균인 *A. apis*의 검출법을 개발하고 이 검출법을 최적화하여 양봉현장에서 실제로 적용가능한가를 검토하고자 하였으며, 또한 현장 적용 가능성을 높이기 위해 Fluorescent Dye를 사용하여 육안으로 확인할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 꿀벌 시료의 수집

본 연구에서 사용된 꿀벌 시료는 질병의 진단을 위하여 국내 양봉가로부터 한국꿀벌질병연구소로 2010년에 위탁된 것으로 성충시료를 사용하였다. 이 시료들은 연구소에 도착한 즉시 외형 관찰과 해부검사를 수행한 뒤 chromosomal DNA의 추출에 사용하였다. 본 연구에서 사용된 꿀벌 시료는 질병의 진단을 위하여 국내 양봉가로부터 한국꿀벌질병연구소로 2010년에 위탁된 것으로 성충시료를 사용하였다. 이 시료들은 연구소에 도착한 즉시 외형 관찰과 해부검사를 수행한 뒤 chromosomal DNA의 추출에 사용하였다.

(2) Chromosomal DNA의 추출

MagNa Lyser (Roche, Switzerland)를 사용하여 꿀벌을 분쇄 시킨 후, AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Inc., Korea)를 사용하여 꿀벌의 chromosomal DNA를 추출하였으며, 실험은 제작자의 지시에 따라 진행하였다. 추출된 chromosomal DNA는 OD 260nm에서 농도를 측정 후 LAMP 반응에 사용하였고, 잔여 chromosomal DNA는 초저온 냉동고(-70℃ 이하)에 보관하였다.

(3) Clone의 배양 및 plasmid DNA의 순수분리

이 등(2006)에 의하여 *A. apis*의 18S rRNA gene의 일부(GenBank, M83264.1; 671-1666bp)가 cloning된 균을 LB배지에서 37℃, 16시간동안 200rpm으로 배양하였다. 배양된 균은 DNA-spin™ Plasmid DNA purification Kit (Intron, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 추출하였으며, 실험은 제작자의 지시에 따라 진행하였다. 추출된 plasmid DNA는 농도를 측정하고 LAMP법에 사용하였으며, 잔여 plasmid DNA는 초저온 냉동고(-70℃ 이하)에 보관하였다.

(4) *A. apis*-LAMP법의 primer 설계 및 제작

A. apis LAMP에 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다. Forward inner primer인 *A.apis*-FIP는 *A.apis* anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(F2)과 TTTT linker 그리고 loop를 형성하는 염기서열(F1c) 부분을 합한 것으로 44nt의 long-nucleotide로 제작하였다. Reverse inner primer인 *A.apis*-BIP는 *A.apis* sense sequence의 상보적인 염기서열(B2)과 TTTT linker, loop를 형성하는 염기서열(B1c) 부분을 합한 것으로 각각 46nt의 long-nucleotide로 제작하였다. 또한 outer primer인 *A.apis*-F3와 *A.apis*-B3는 inner primer들의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각각 19nt의 크기로 제작하였다. 이 primer들은 Bionics 사(Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 inner primer의 경우에는 PAGE 정제 후 사용하였다(Fig.

2).

Table 1. Primers of *A.apis*-LAMP.

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
<i>A.apis</i> -F3	GCCGATGGAAGTTTGAGGC	19
<i>A.apis</i> -B3	ACAAGCTGATGACTTGCGC	19
<i>A.apis</i> -FIP ¹⁾	TTGGCCCTGTCATGTGAGGC-TTTT-ACAGGTCTGT GATGCCCTTA	44
<i>A.apis</i> -BIP ²⁾	TGTTAAACCCTGTCGTGCTGGG-TTTT-AGGCATTC CTCGTTGAAGAG	46

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

5'-GACGTTTGTCGGCTGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTCTTAAGCCGATGGA
A. apis-F3 *A. apis*-F2
AGTTTGAGGCAATAACTGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGC
 (sense) *A. apis*-F1(loop)
TACTACTGACAGGGCCAACGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGT
A. apis-B1(loop)
TAAACCCTGTCGTCTGGGGATAGACATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATGCC
A. apis-B2(anti-sense) *A. apis*-B3
 TAGTAGGCGCAAGTCATC-3'

Fig. 2. Nucleotide sequences and location of primers for *A. apis*-LAMP

(5) *A. apis*-LAMP의 최적 반응온도 측정 및 반응시간 제한

*A. apis*의 검출을 위하여, primer와 *Bst* DNA polymerase의 활성을 위한 최적 온도를 측정하였다. 반응액은 주형인 *A. apis* plasmid (이 등, 2006) 1ng, inner primer인 *A. apis*-FIP/BIP는 각각 40pmole, outer primer인 *A. apis*-F3/B3는 각각 10pmole, 2.5mM dNTP, 10×Reaction buffer, 8U *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A), DMSO(최종농도 5%)를 첨가하여 총 30μl로 조성하였다.

Bst DNA polymerase는 80℃ 이상이 되면 불활성화 되기 때문에, 94℃에서 5분간 DNA를 해

리시킨 뒤 바로 얼음으로 옮겨 온도를 내린 후에 첨가하였으며, 이 후 60분간 DNA 신장을 진행하고 80℃에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. DNA 신장의 최적온도 측정은 45-65℃ 구간에서 1시간 동안 등온조건하에서 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하여 *A. apis* LAMP에 대한 최적온도를 측정하였다.

측정된 최적온도를 바탕으로 동일조성의 LAMP 반응액을 각각 20분, 30분, 40분, 50분, 60분간 최적 온도에서 반응시켜, 시간제한에 따른 검출한계를 측정하였다.

(6) *A. apis*-LAMP의 최적 반응액 조성

A. apis-LAMP의 최적 반응조건을 확립하기 위하여 여러가지 조성 성분에 대한 최적 조건을 확인하였다. Primer의 농도는 Notomi 등 (2000)이 제시한 outer primer와 inner primer의 농도가 1:4 일 때 가장 높은 효율을 보였다는 결과를 바탕으로 이 비율을 유지하되 primer의 절대농도만을 변화시켜 그 결과를 측정하였다. 즉, inner primer의 각 농도를 5pmole, 10pmole, 20pmole, 40pmole, 60pmole로 하여 LAMP를 수행하였으며 이 때 outer primer의 각 농도는 1.25pmole, 2.5pmole, 5pmole, 10pmole, 15pmole로 맞추었다.

또한 dNTP의 농도는 각각 2.5mM, 5.0mM, 7.5mM, 10.0mM, 12.5mM로 조성하여 측정하였고, *Bst* DNA polymerase의 경우에는 각각 4U, 8U, 12U, 16U, 20U을 첨가하여 조성함으로써 최적 반응조건을 확립하였다.

(7) Restriction을 통한 *A.apis*-LAMP 생성물 확인

A. apis-LAMP법을 통해 신장된 DNA가 *A. apis*-specific DNA가 맞는지 확인하기 위하여, 반응이 종료된 LAMP 반응액에 *HaeIII* (Invitrogen, U.S.A.) 제한효소를 첨가하였다. 반응액 총량은 20 μ l로 LAMP product 8 μ l, 20U의 *HaeIII*를 첨가하여 37℃에서 2시간동안 정치한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

(8) *A. apis*-LAMP에서 primer의 검출한계

*A. apis*의 검출에 있어 *A. apis*-LAMP의 검출한계를 측정하기 위하여 pBX-*A. apis* plasmid의 copy수를 아래의 식에 따라 계산하여 1 \times 10⁸ copies/ μ l부터 1/10씩 단계희석한 후, 각각의 희석액 1 μ l를 주형으로 하여 확립된 최적 조건에서 LAMP를 수행하였다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration} (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g/mol})} = \text{amount} (\text{copies}/\mu\text{l})$$

(9) 꿀벌시료에서의 LAMP법과 PCR법에 의한 *A. apis* 검출

양봉현장에서의 *A. apis*-LAMP법의 적용 여부와 PCR법을 이용한 진단과 비교했을 때 얼마나 효율적인지 확인하기 위하여 같은 꿀벌시료를 이용하여 *A. apis*-LAMP법 및 *A. apis* 특이 real-time PCR법(이 등, 2005)을 이용하여 진단하였다. 백목병 감염이 의심되는 꿀벌로부터 chromosomal DNA 추출 후, 이를 주형 DNA로 사용하였다.

(10) Fluorescent Dye test

반응이 종료된 LAMP 반응액을 전기영동의 수행없이 확인하기 위하여, DNA 이중 가닥에 삽입되어 녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I 과 GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye (Baygene Biotech Company Limited, China)를 이용하여 관찰하였다. SYBR Green I 을 사용한 반응액은 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하였으며, GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용한 반응액은 형광등 아래에서 관찰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) *A. apis*-LAMP의 최적 반응온도의 측정 및 반응시간 제한

LAMP 반응의 최적 반응조건을 측정하기 위하여 pBX-*A. apis* plasmid DNA를 주형 DNA로 사용하였다. 최적 등온온도를 측정하기 위하여 50.0°C, 52.5°C, 54.2°C, 56.4°C, 60.0°C에서 1 시간 동안 각기 등온조건하에서 *A. apis*-LAMP를 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하였다. 50.0-56.4°C 의 범위에서 *A. apis*-specific DNA가 신장되는 것을 확인하였으며, 신장된 DNA는 추론된 200bp의 산물부터 loading well까지 다양한 크기로 나타났다 (Fig. 3-A). LAMP 반응산물은 전기영동상에서 몇몇의 각기 다른 크기의 DNA band로 타나는데, 그 까닭은 LAMP 산물이 몇몇의 inverted-repeat 구조를 구성하기 때문이다. 따라서 LAMP 법에 의한 DNA 증폭은 PCR법에 의한 증폭이 특이 DNA band를 나타내는 것과 달리

ladder 같은 pattern으로 나타난다. *A. apis*-LAMP의 최적 등은 온도는 반복실험을 통하여 54°C 로 측정되었으며, 이후의 실험은 최적 온도인 54°C에서 수행하였다.

한편, LAMP의 최단 반응시간을 측정하기 위하여 54°C에서 각각 20분, 30분, 40분, 50분, 60분간 반응시킨 뒤, 전기영동을 통해 확인하였다. 그 결과 최소 30분이상의 반응 뒤에 전기영동을 통해 DNA 신장을 확인할 수 있었다(Fig. 3-B).

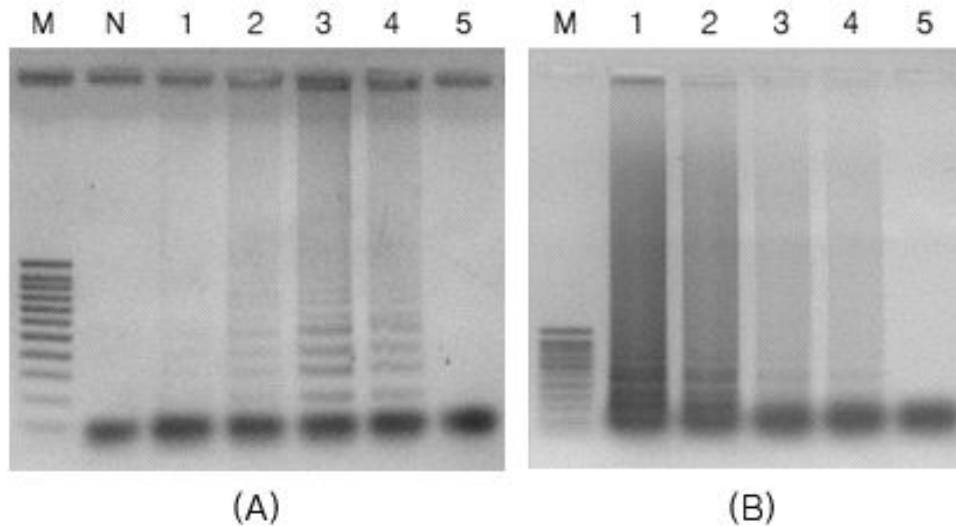


Fig. 3. Temperature gradient *A. apis* LAMP. And time limited for elongation. Panel A. Temperature gradient *A. apis* LAMP. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1 to 5 were specific LAMP product from each LAMP under isothermal temperature at 50.0, 52.5, 54.2, 56.4, and 60.0°C, respectively. Lane N is without template. Optimal elongation temperature was determined at 54.0°C. Panel B. Time limited for elongation. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1 is LAMP product during 60 min. Lane 2 is LAMP product during 50 min. Lane 3 is LAMP product during 40 min. Lane 4 is LAMP product during 30 min. Lane 5 is LAMP product during 20 min.

(2) *A. apis*-LAMP의 최적 반응액 조성

A. apis-LAMP의 최적 반응조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP, *Bst* DNA polymerase의 최적 농도를 구하였다.

Primer의 경우 inner primer가 각각 80pmole, outer primer가 각각 20pmole일 때 가장 많은 LAMP 생성물이 형성되었으며(Fig. 4-A), 반복실험을 통하여 primer의 최적농도를 inner primer는 80pmole, outer primer는 20pmole로 결정하였다.

한편, *A. apis*-LAMP에서 dNTP의 최적 농도를 확립하기 위하여 각 반응액에 2.5mM, 5.0mM, 7.5mM, 10.0mM, 12.5mM의 dNTP를 첨가하여 LAMP를 수행하고 그 생성물의 양을 전기영동을 통하여 비교하였다(Fig. 4-B). 그 결과 dNTP의 양이 10mM일 때, loading well까지 DNA의 신장이 가장 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

미량의 특이 DNA를 검출하고자 하는 본 연구에서 *Bst* DNA polymerase가 반응시간동안 긴 DNA까지 다양하게 합성해 낼 수 있는 점은 실험 결과의 판정에 매우 중요한 것이라 판단되며, 이를 통하여 과량의 dNTP는 LAMP의 반응을 저해한다는 사실을 알 수 있었다. 따라서 반복실험을 통해 연속적 합성과정이 중단되지 않는 반응조건을 고려하여 *A. apis*-LAMP에서 dNTP의 최적 농도를 10mM로 결정하였다.

Bst DNA polymerase의 경우 각각 4U, 8U, 12U, 16U, 20U을 첨가하여 LAMP를 수행하였다. 4U을 첨가한 경우에는 loading well까지 DNA가 신장되었으나 8U 이상에서는 loading well까지 DNA가 신장되지 않았다. 4U을 첨가하였을 때 다양한 크기와 많은 생성물이 확인되어 *Bst* DNA polymerase의 최적농도를 4U으로 판정하였다(Fig. 4-C).

따라서 *A.apis*-LAMP를 위한 최적 반응액 조성은 총 30 μ l를 기준으로, 각각 80pmole의 inner primer, 각각 20pmole의 outer primer, 10mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 4U *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A)로 결정하였으며, 54 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 30분간 수행하는 것을 *A. apis*-LAMP의 표준조건으로 결정하였다.

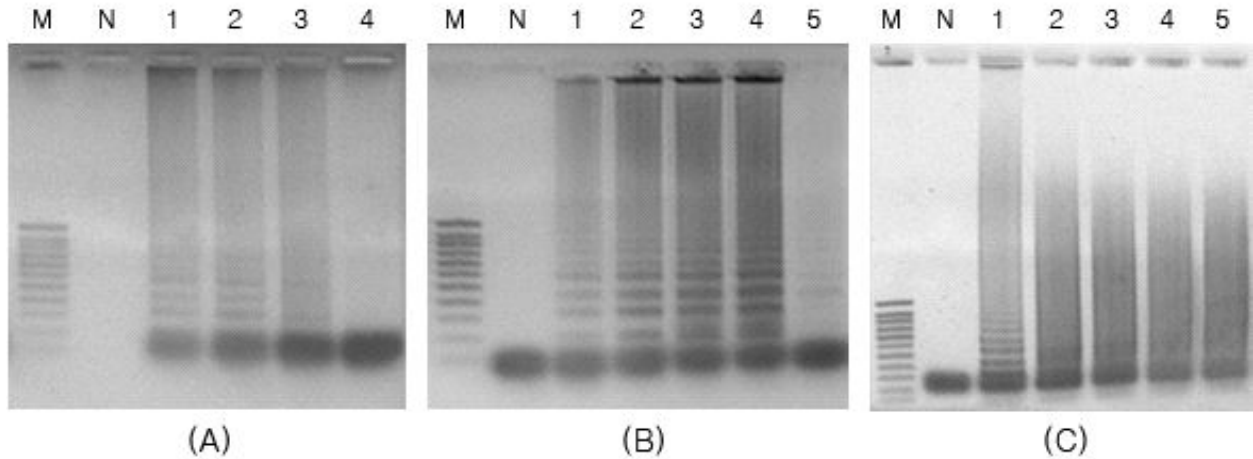


Fig. 4. The optimal concentration of reaction solutions in *A. apis* LAMP.

Panel A. The optimal concentration of primers. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N, 0pmole *A. apis*-FIP/BIP and 0pmole *A. apis* -F3/B3; Lane 1, *A. apis* LAMP using 40pmole *A. apis* -FIP/BIP and 10pmole *A. apis* -F3/B3; Lane 2, *A. apis* LAMP using 80pmole *A. apis* -FIP/BIP and 20pmole *A. apis* -F3/B3; Lane 3, *A. apis* LAMP using 120pmole *A. apis* -FIP/BIP and 30pmole *A. apis* -F3/B3; Lane 4, *A. apis* LAMP using 160pmole *A. apis* -FIP/BIP and 40pmole *A. apis* -F3/B3. Panel B. The optimal concentrations of dNTP. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N is negative control. Lane 1 to 5, LAMP products using 2.5 mM; 5 mM; 7.5 mM; 10 mM; 12.5 mM dNTP. The optimal concentration of dNTP was determined at 10mM. Panel C. The optimal concentration of Bst DNA polymerase. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N is negative control. Lane 1 to 5, LAMP products using 4U; 8U; 12U; 16U; 20U Bst DNA polymerase. The optimal concentration of Bst DNA polymerase was determined at 4U.

(3) Restriction을 통한 *A.apis*-LAMP 생성물 확인

A. apis 검출을 위한 표준 LAMP법을 통해 신장된 DNA가 *A. apis* specific DNA가 맞는지 확인하기 위하여, 반응이 종료된 LAMP 반응액에 *HaeIII* 제한효소를 첨가하고, 37°C에서 2시간동안 정치한 뒤 전기영동을 통해 확인하였다. 제한효소를 처리하지 않은 lane 1에서는 loading well까지 신장된 DNA를 관찰할 수 있었으며, lane 2에서는 제한효소에 의해 DNA가 절단된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 *A. apis*-LAMP법에 의하여 신장된 DNA는 *A. apis*-specific DNA임이 확인되었다.

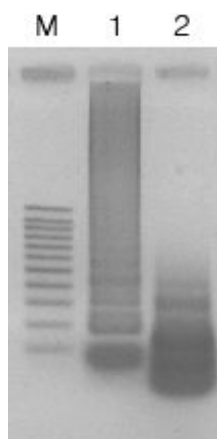


Fig. 5. Electrophoretic pattern of the LAMP and *HaeIII* digested product. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1 is LAMP product. Lane 2 is *HaeIII* digested product.

(4) *A. apis*-LAMP의 민감도 확인

*A. apis*에 대한 *A. apis*-LAMP의 검출한계를 특정하기 위하여 pBX-*A. apis* plasmid를 1×10^8 copies/ μ l부터 1×10^2 copy까지 1/10씩 단계별로 희석한 후, 희석액 1 μ l를 주형으로 사용하였다. 검출한계 측정 결과 1×10^3 copies까지 *A. apis*-LAMP를 통해 검출할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig. 6)

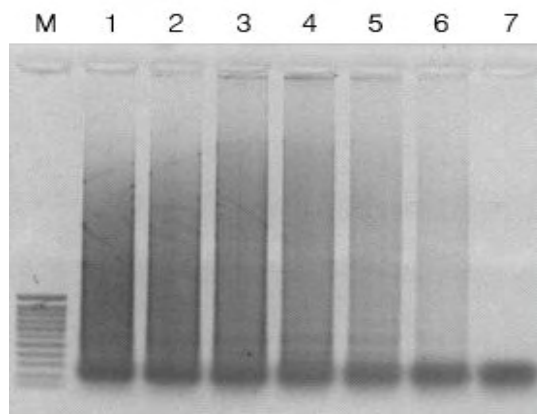


Fig. 6. Sensitivity test of primers in *A. apis* LAMP

Detection limit of *A. apis* LAMP. pBX-*A. apis* solution containing 1×10^8 copies/ μ l was serially 10-fold diluted. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1, *A. apis* LAMP with using 1×10^8 copies/ μ l. Lane 2, *A. apis* LAMP with using 1×10^7 copies/ μ l. Lane 3, *A. apis* LAMP with using 1×10^6 copies/ μ l. Lane 4, *A. apis* LAMP with using 1×10^5 copies/ μ l. Lane 5, *A. apis* LAMP with using 1×10^4 copy/ μ l. Lane 6, *A. apis* LAMP with using 1×10^3 copy/ μ l. Lane 7, *A. apis* LAMP with using 1×10^2 copy/ μ l

(5) 꿀벌시료에서의 LAMP법과 PCR법에 의한 *A. apis* 검출

*A. apis*에 감염되었다고 의심되는 꿀벌시료를 이용하여 *A. apis*-LAMP 및 PCR을 이용하여 *A. apis*를 검출하고자 하였다. LAMP법은 *A. apis*-LAMP 표준조건에 따라 수행하였으며, PCR법은 이 등(2005)에 의해 개발된 방법으로 수행하였다. 그 결과 LAMP법과 PCR법으로 검출을 수행한 두 경우 모두에서 DNA의 증폭이 성공적이었다(Fig. 7). 따라서 LAMP법에 의한 *A. apis* 검출이 PCR법에 견주어 보았을 때 부족함이 없다고 할 수 있다.

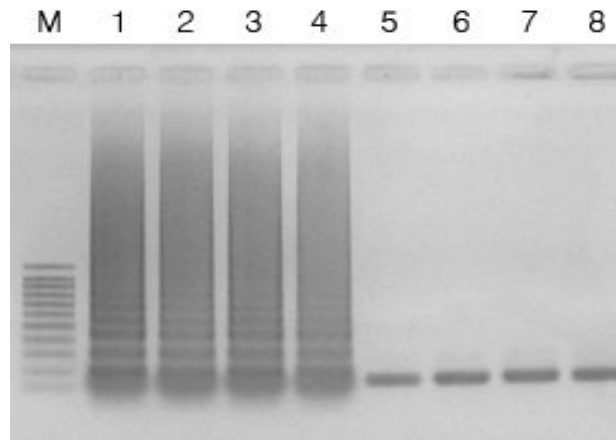


Fig. 7. Application of LAMP to clinical samples and conventional PCR. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1-4 are reaction product by LAMP. Lane 5-8 are reaction product by PCR. Not only LAMP product but also PCR product is amplified.

(6) Fluorescent Dye test

실제 꿀벌시료에서 DNA를 추출하여 *A. apis*-LAMP 표준조건에 따라 반응시킨 뒤, 반응이 종료된 LAMP 반응액을 전기영동의 수행없이 확인하기 위하여 DNA 이중 가닥에 삽입되어 녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I과 GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye (Baygene Biotech Company Limited, China)를 각각 첨가하였다. SYBR Green I을 사용한 반응액은 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하였으며, GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용한 반응액은 형광등 아래에서 관찰하였다.

그 결과 SYBR Green I 을 사용한 경우에는 감염시료에서 좀 더 밝은 형광이 관찰되었으며(Fig. 8-A), GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용한 경우에는 감염시료에는 녹색, 비감염시료에는 주황색의 발현이 확인되었다(Fig. 9-A).

이는 전기영동없이 맨눈으로 DNA 신장 여부 확인을 가능케 함으로써 현장진단에 매우 유용할 것으로 사료된다.

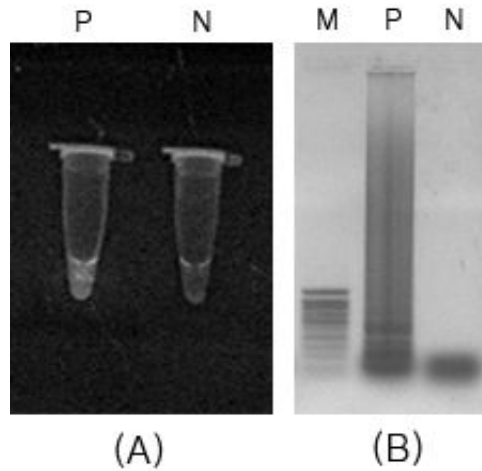


Fig. 8. SYBR Green I test of *A. apis* LAMP. Panel A. LAMP product (P) and negative control (N) and were stained by SYBR Green I. Each products were observed by ultraviolet transilluminator. Panel B. Each products observed by ultraviolet transilluminator were analyzed by gel electrophoresis. Lane M is 100bp ladder marker (Forever). Lane P is LAMP product on honeybee infected by *A. apis*. Lane N is LAMP product on honeybee uninfected by *A. apis*.

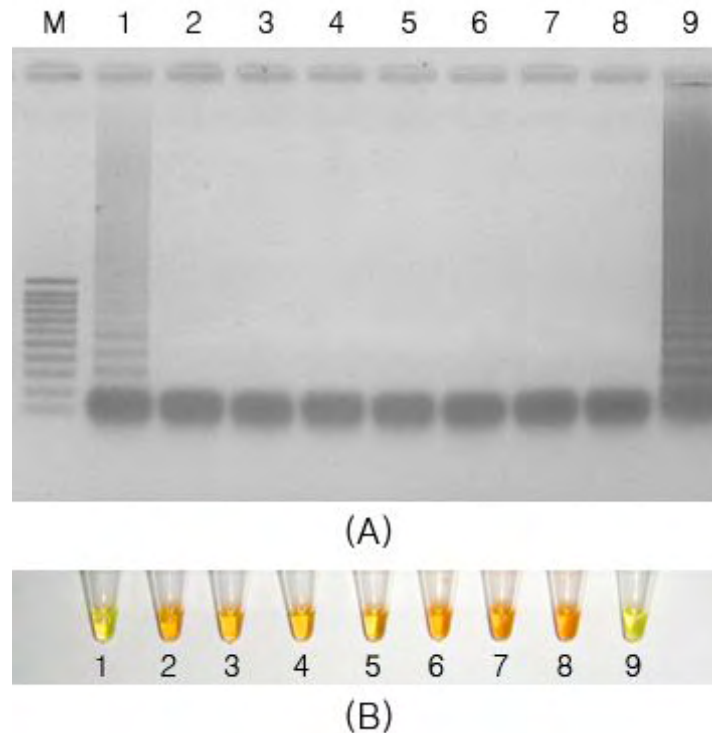


Fig. 9. GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye test of *A. apis* LAMP. Panel A. Each products observed by ultraviolet transilluminator were analyzed by gel electrophoresis. Lane M is 100bp ladder marker (Forever). Lane 1 and 9 are LAMP product on honeybee infected by *A. apis*. Lane 2-8 is LAMP product on honeybee uninfected by *A. apis*. Panel B. All products in the reaction tubes were dyed using GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye. A positive reaction appeared green and a negative reaction appeared orange in daylight.

본 연구는 LAMP법을 기반으로 *A. apis*를 간편하고 빠르게 검출하는 방법의 확립을 목적으로 하였다. LAMP법은 임상의 병원체의 검출을 적은 비용으로 빠르고 쉽게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 특이성과 민감도도 높다고 알려져있다.

본 연구에서 개발된 *A. apis*-LAMP는 *A. apis* 18S ribosomal RNA gene (GenBank, M83264.1)를 target으로 하여 설계된 4개의 primer, 즉 *A. apis*-F3/B3/FIP/BIP를 이용한다. *A. apis*-LAMP를 위한 최적 반응액의 조성은 총 30 μ l를 기준으로, 각각 80pmole의 inner primer, 각각 20pmole의 outer primer, 10mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 4U Bst DNA polymerase (NEB, U.S.A)이며, 54 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 30분간 *A. apis*-specific DNA를 선택적으로 신장시킨

다.

또한 *A. apis*-LAMP는 1×10^3 copies까지 검출이 가능하며, 실제 꿀벌시료에서도 검출가능함을 확인하였다. 또한 고가의 장비인 thermocycler없이 항온기만으로도 실험수행이 가능하며, SYBR Green I과 GeneFinder™ Nucleic acid fluorescent dye 시약을 이용하여 맨눈으로 DNA 신장 확인여부를 확인할 수 있음이 확인되었기에 현장에서 바로 적용가능하여 매우 유용할 것으로 사료된다.

라. 적 요

꿀벌의 진균성 질병으로 알려져 있는 백목병(Chalk brood disease)의 원인균은 *Ascospaera apis* (*A. apis*)으로, 꿀벌유충에 병을 유발시킨다.

본 연구에서는 *A. apis*를 특이적으로 검출하는 LAMP법을 개발하였다. 이 방법은 등온에서 DNA를 빠르고 효율적으로 증폭시키며 특이성이 높다. *A. apis* 18S ribosomal RNA gene (GenBank, M83264.1)을 바탕으로 *N. ceranae* 특이 primer 4개(*A. apis*-F3/B3/FIP/BIP)를 설계하였다. 최적조건의 확립 후 *A. apis*-specific template로부터 54℃의 등온조건 하에서 30분만에 성공적으로 DNA 신장이 이루어지며, *A. apis*에 감염된 실제 꿀벌시료에서도 성공적으로 신장되는 것을 확인되었다. 또한 LAMP 반응여부를 서로 다른 색깔을 통해, 전기영동없이 육안으로 확인할 수 있었다.

따라서 *A. apis*-LAMP는 현장에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되며, *A. apis*에 의한 자연적인 감염도 모니터링 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 절 CBPV 검색을 위한 LAMP 신규 검출법의 개발

1. LAMP법을 이용한 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)의 신속 진단법 개발

가. 서론.

꿀벌은 세계 식량의 25%에 해당하는 다양한 작물의 수분을 매개하며 인간이 살아가고 생태계가 유지되는데에 기여도가 매우 크다(Morse and Calderone, 2000). 또한 꿀을 비롯한 다양한 양봉산물은 기능성 식품뿐만 아니라 질병 치료제 등 여러 방면으로 이용되고 있다(Klein *et al.*, 2007)

2006년 후반, 미국에서 봉군붕괴현상(CCD, colony collapse disorder)이 보고되었으며(van Engelsdorp *et al.*, 2007), 이러한 꿀벌의 실종은 작물의 수분 매개를 감소시켜 식량난을 야기시키는 심각한 결과를 초래할 수 있어 세계적으로 관심이 높은 관심을 불러일으키고 있다. CCD와 관련하여 꿀벌의 마비병을 일으키는 Acute bee paralysis virus (ABPV), Israel acute paralysis virus (IAPV), Chronic bee paralysis virus (CBPV)가 그 원인 바이러스 중 하나로 주목을 받고 있다(Diana *et al.*, 2007).

특히 CBPV는 single-stranded RNA 바이러스로 DNA stage를 가지지 않으며, 명확한 분류가 이루어지지 않았다. 꿀벌의 성충에게 만성마비를 일으키며 1963년 최초로 분리되어 그 특징들이 기술되어졌다((Bailey *et al.*, 1963; Bailey *et al.*, 1968). CBPV에 감염된 성충은 날지 못하고 기어다니며 노제마 병과 유사한 증상을 일으키는 것이 특징이다(Ribiere *et al.*, 2002). CBPV는 마비를 일으키는 다른 바이러스들에 비하여 만성적으로 증세가 진행되며, 배설물 등을 이용하여 전염이 가능하기 때문에 봉군 전체에 쉽게 감염을 확산시킬 수 있어(Ribiere *et al.*, 2002) 쉽고 빠른 조기 진단의 필요성이 더해진다.

국내에서 특이 염기서열을 이용한 CBPV의 검출법으로는 최 등(2008)에 의한 minus strand specific RT-PCR에 의한 진단법이 최초로 보고된 이후, real-time PCR 진단법(유 등, 2010A), 빠른 진단을 위한 ultra-rapid real-time PCR법(유 등, 2010B)등이 보고되어있다. 그러나 위 방법들은 CBPV의 특이 염기 서열을 이용하므로 정확도는 높지만 고가의 장비와 전문적인 기술을 요하므로 실험실이 아닌 현장에 직접 적용하기에는 제약이 있을 수 있다.

한편 Notomi 등(2000)은 등온에서 특정 유전자를 증폭시키는 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)법을 고안하였다. 이 방법은 strand displacement activity가 높은 *Bst* polymerase를 이용함으로써 유전자가 loop를 형성하면서 증폭된다. LAMP를 수행하기 위해서는 증폭시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 primer를 사용하게 된다(Blomstrom *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Nagamine *et al.*, 2002). 이는 일반 PCR이 2개의

위치를 인식하는 것과 비교했을 때, LAMP는 target DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미한다(Notomi, 2007).

LAMP의 가장 큰 특징은 등온에서 유전자의 증폭이 이루어진다는 점으로, 온도의 구배가 필요한 PCR에 비해서 등온 조건은 몇 가지 이점을 가지고 있다. 먼저 온도 조절이 필요 없기 때문에 상대적으로 반응 시간이 짧아진다. 따라서 좀 더 빠른 시간 내에 유전자 증폭을 가능하게 한다. LAMP를 이용한다면 전기영동 시간을 제외하고 한 시간 내에 유전자 증폭이 가능함을 기존 여러 논문에서 이미 보고되었다(Ohori *et al.*; 2006, Xu *et al.*, 2009). 더구나 온도 변화에 따른 DNA 손실 및 손상이 없기 때문에 증폭 효율이 매우 높다(Wansika *et al.*, 2007). 또한 등온 조건에서의 증폭은 LAMP가 다른 검출 방법들과 달리 현장성을 가질 수 있다는 근거가 된다(Yoshiteru *et al.*, 2006). 일정한 온도만 유지하면 되기 때문에 고가의 장비가 필요 없이 항온수조 등 간단한 장비만을 가지고도 반응이 가능하다. 따라서 LAMP를 이용한다면 굳이 실험실 내에서의 환경이 아니더라도 현장에서 특정 유전자의 검출이 가능해진다.

본 연구에서는 현장 적용성이 높은 LAMP법을 이용하여, 보다 신속하고 간편하게 꿀벌의 만성마비병을 일으키는 Chronic bee paralysis virus를 검출할 수 있는 진단법을 새로이 개발하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) CBPV clone 준비

본 연구에서는 CBPV sequence (GeneBank No. EU122231) 의 99%의 상동성을 보이는 sequence와 pGEM T vector를 포함하는 AM-CBPV clone (최 등, 2008)을 사용하였다. AM-CBPV clone은 최적조건 확인, 민감도 확인 등의 실험에 PCR 주형으로 사용되었다.

(2) LAMP primer 제작

LAMP primer designing software인 PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)를 이용하여 CBPV 특이 LAMP용 primer를 제작하였다. CBPV-LAMP의 FIP primer는 CBPV anti-sense sequence의 상보적인 염기서열과 loop를 형성하는 sequence의 부분 TTTT spacer로 합하여 41nt의 long-nucleotide로 제작되었다. BIP primer도 마찬가지로 CBPV anti-sense sequence의 상보적인 염기서열과 loop를 형성하는 sequence의 부분 TTTT spacer로 합하여 39nt의 long-nucleotide로 제작되었다. 또한 F3과 B3 primer는 각각 inner primer의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각기 18nt의 크기로 제작하였다. 이 primer들은 Bionics사(Korea)에 주문 의뢰하여 제작하였으며 inner primer들에 대해서는 PAGE 정제 된 것을 사용하였다 (Figure 1, Table 3).

TCAGACACCGAATCTGATTATTGTGAAGCCCAAACCTGGAAGTCATCCGTAGA
 TCTGGCTCTAACGCCGTTTGGCAGCCCTCTCTCGTACTGGAGACGAGAGAGGA
 CGGGACCAAGCTCATCCACCTACCAGTACAACATACCCCTCTCGCAGTCCCAGT
 CAACCTTGCCAGATTTATTACCACCGAAGCGGTTCAAGAGATCTCAGACCAACT
 CCTGCGCGTCCCACCCGATAACATCGAGAGGTGCCGACACATACTTCACTCTCT
 CATCAAACGGGAGTCCGGATCCCCGAGACTCCGTTACGCCAATTCGTCGAA
 CBPV_LAMP_F3 CBPV_LAMP_FIP
 GAATTCTTAACGACGCCTCAGATGAGTTGGTTGAAGAGGGTGCAATCCCCTGTA
 CBPV_LAMP_FIP
 GATTTCTCGATATGGATCAAACGCTACCCAGAATGGCGTCAACGGCAGCTCATC
 CBPV_LAMP_BIP
 GCCGCACGAAATCGCGTCCCTCAGCGACCCAGAACCCTCCCGCAAGTACGCCTT
 CBPV_LAMP_BIP CBPV_LAMP_B3
 GATAAAGAACTTTGTCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTCGTGGATCCAAGAA
 ACATCAGTCCACGAAGCGACGAGTTTCTAGTAGT

Figure 1. Sequences and locations of four primers for CBPV-LAMP

This sequences are shown AM-CBPV clone. Upper six parts are need for designing four primers to LAMP.

Table 1. Specific primers for CBPV-LAMP

name	sequence (5'→3')	reference
CBPV_LAMP_F3	CATCAAACGGGAGTCCGG	This study
CBPV_LAMP_B3	ATCAAGGCGTACTTGCGG	This study
CBPV_LAMP_FIP	TGCACCCTCTTCAACCAACTCA-TTTT -GACTACTCCGTTACGCCAAT	This study
CBPV_LAMP_BIP	AACGCTACCCAGAATGGCGTC-TTTT -GTTCTGGGTCGCTGAGGA	This study

(3) LAMP법의 최적 반응 온도 확립

CBPV-LAMP의 특이적 검출을 위하여 반응 최적 온도를 확인하고자 하였다. 조성은 AM-CBPV clone 1ng/μl과 20pM inner primers, 10pM outer primers, 8U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs, USA), 1×ThermoPol Reaction Buffer (20mM Tris-HCl, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, New England Biolabs, USA), 10mM dNTP, 5% DMSO, D.W로 총 50μl의 반응액을 조성하였다. *Bst* polymerase large fragment는 80℃ 이상의 온도에서는 불활성을 나타내므로 먼저 94℃에서 5분간 해리 후 바로 얼음에 옮긴 후, 따로 첨가하였다. 이후 1시간동안 DNA변형합성을 진행하였고, 80℃에서 10분간 반응시킨 후 종료하였다. DNA 변형 합성의 최적 온도 측정은 50.0℃~65.0℃ 사이에서 각기 등온조건하에서 실시하였으며, 각 LAMP반응이 끝난 후 증폭산물들은 1.5% agarose gel을 이용하여 100V에서 25분간 전기영동(Mupid-one, Advance, Japan) 하

였다. Agarose gel은 ethidium bromide (Sigma Chemical Co.)로 염색하여 UV상에서 관찰하였다.

(4) LAMP법의 최소 반응 시간 확인

CBPV-LAMP의 빠른 진단을 위하여 CBPV 검출에 필요한 최소 반응 시간을 확인하고자 하였다. 94℃에서 5분간 해리 후, Bst polymerase를 첨가한 반응액의 polymerization 시간을 60분, 50분, 40분, 30분, 20분, 10분으로 조절하여 그 증폭 정도를 비교하였으며, LAMP 조건은 확립된 표준조건으로 수행하였다.

(5) CBPV-LAMP의 민감도 확인

CBPV를 검출함에 있어 CBPV-LAMP의 검출한계를 측정하기 위하여 초기 기질양에 따른 CBPV-LAMP를 각기 수행하였다. AM-CBPV clone을 1×10^8 부터 1×10^3 까지 단계적으로 희석하여 주형으로 사용하였으며, LAMP 조건은 본 연구에서 확립된 표준조건으로 수행하였다. 주형가닥의 copy수는 아래의 계산식을 따랐다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration} (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g/mol})} = \text{amount} (\text{copies}/\mu\text{l})$$

(6) SYBR Green I 을 이용한 CBPV의 형광 검출

증폭이 끝난 LAMP 반응액을 전기영동 없이 확인하기 위하여 SYBR Green I 을 이용하여 관찰하였다. 이는 SYBR Green I 이 이중가닥에 결합하여 형광을 나타내는 특성을 이용하여 증폭산물을 형광을 통해서 쉽게 확인하기 위함이다. LAMP 조건은 확립된 표준조건을 따랐으며, 반응이 끝난 tube를 UV하에서 관찰하여 형광을 확인하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) LAMP법의 최적 조건 확립

CBPV-LAMP의 최적 반응온도를 확인하기 위하여 반응 온도를 50.0℃~60.0℃으로 각기 등온 조건을 유지시킨 후 실험을 수행하였다. 50.0℃부터 60.2℃의 범위에서 증폭이 가능함을 확인하였다. 53.4℃에서 증폭이 가장 활발함을 확인하였으며, 그 이하의 온도에서 증폭 여부가 민감하게 변화하는 것으로 나타났다. 따라서 CBPV-LAMP의 최적 온도는 약 54℃로 확인되었으며, 그 이상의 온도에서는 어느 정도 활성이 유지되는 것으로 판단된다(Figure 2).

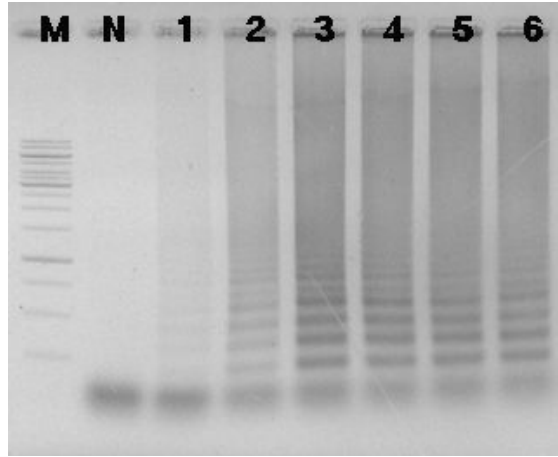


Figure 2. The optimal reaction temperature of CBPV-LAMP

LAMP was performed under range of 50.0°C to 60.0°C as reaction temperature. Lane M is 1kb ladder marker (Fermentas, USA). Lane N is negative control as no template at 50.0°C. Lanes 1 to 6 were carried out at 50.0, 52.0, 53.4, 55.2, 57.2 and 60.2°C, respectively. LAMP products showed in lane 1 to 6. Optimal reaction temperature was determined as 54°C on lane 3.

(2) LAMP법의 최소 반응 시간 확인

CBPV-LAMP의 최소 반응 시간을 확인하기 위하여, 반응 시간을 60분~ 10분으로 각기 조정 한 뒤, 증폭 산물 생성 정도를 비교하였다. 반응 시간이 30분 이상일 경우 증폭이 이루어지는 것이 확인되었으나, 30분의 반응 시킬 경우, 그 증폭 활성이 약한 것으로 나타났다(Figure 3). 따라서 CBPV-LAMP는 약 40분 이상의 반응 시간이 주어진다면 CBPV 검출이 충분히 가능한 것으로 여겨진다

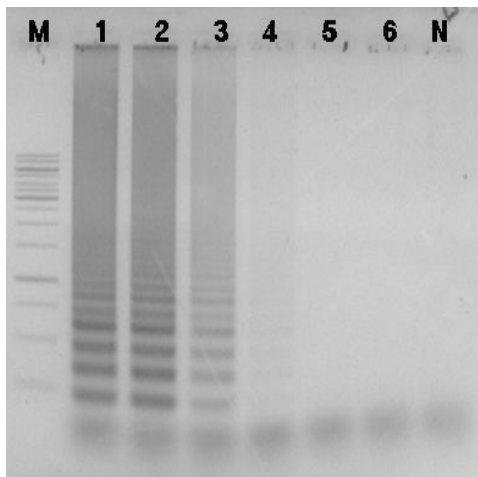


Figure 3. Determination of minimum reaction time of CBPV-LAMP

LAMP was performed under range of 60min to 10min as reaction time after denaturation step. Lane M is 1kb ladder marker (Fermentas, USA). Lane N is negative control as no reaction time. Lanes 1 to 6 were carried out at 60, 50, 40, 30, 20 and 10min, respectively. LAMP products could be amplified in 30 min reaction time.

(3) CBPV-LAMP의 민감도 확인

CBPV-LAMP의 검출한계를 확인하기 위하여 AM-CBPV clone을 1×10^8 부터 1×10^3 copy수까지 단계적으로 희석하여 실험을 수행하였다. 그 결과, copy수가 감소함에 따라 반응성이 단계적으로 낮아지는 것을 확인하였으며 1×10^8 부터 1×10^4 copy수까지 증폭이 이루어졌음을 확인하였다 (Figure 4). 따라서 CBPV-LAMP는 반응 당 1×10^4 copy수까지 검출이 가능한 것으로 판단하였다.

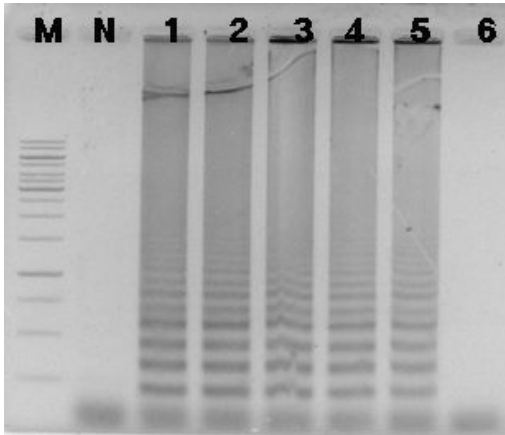


Figure 4. Sensitivity of CBPV-LAMP

Each LAMP was performed the standard condition with different quantities of initial template DNA. Lane M is 1 kb ladder (Fermentas, USA). Lane N is negative control as no template. Lanes 1 to 6 were carried out using 10^8 copies, 10^7 copies, 10^6 copies, 10^5 copies, 10^4 copies and 10^3 copies of template DNA, respectively. The detection limit of CBPV-LAMP using plasmid DNA was set at 10^4 copies/reaction.

(4) SYBR Green I 을 이용한 CBPV의 형광 검출

CBPV-LAMP의 증폭산물을 전기영동 과정 없이 형광으로 확인하기 위하여 표준조건에서 반응이 끝난 반응액의 tube에 SYBR Green I 을 첨가하여 UV하에서 육안으로 형광 검출 여부를 확인하였다. 증폭 산물이 UV 하에서 형광을 발하는 것으로 확인되었으며(Figure 5A), Primer dimer에 의한 형광은 증폭산물에 의한 형광에 비교했을 때 비교적 약하기 때문에, negative control과 비교한다면 SYBR Green I 을 이용하여 전기영동 과정 없이 쉽게 LAMP 증폭산물을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

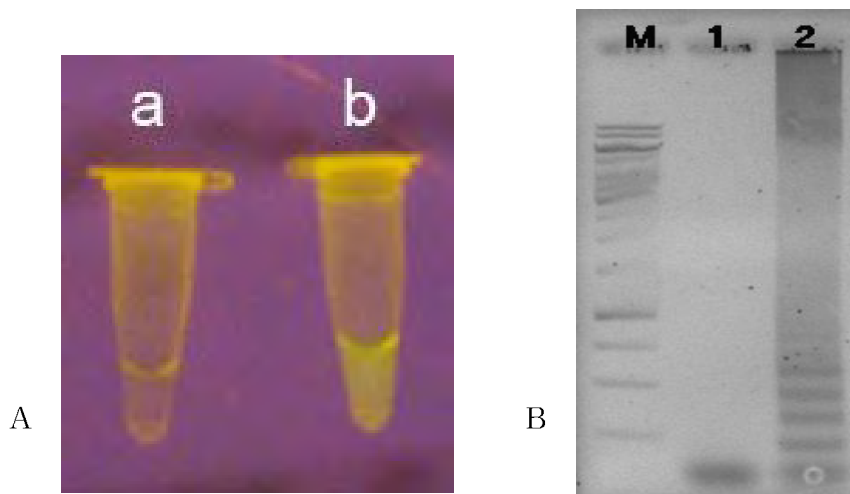


Figure 5. Observation of LAMP product by SYBR Green I

Panel A. SYBR Green I test. a is negative control as no template. Fluorescence was observed in b tube. Panel B. electrophoresis of SYBR Green I test. Lane M is 1 kb ladder (Fermentas, USA). Lanes 1 and 2 show the results of SYBR Green I test for tubes a and b, respectively. LAMP product was observed by fluorescence with of SYBR Green I in b tube.

본 연구는 꿀벌의 만성마비병을 일으키는 Chronic bee paralysis virus (CBPV)를 특별한 장치 없이 보다 간단한 방법으로 검출하기 위하여 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)를 이용한 진단법을 개발하였다. CBPV-LAMP로 명명되어진 본 진단법은 54°C의 반응온도에서 최적의 활성을 보이며 최적 조건 내에서 반응당 1×10^4 copy수의 검출이 가능함이 입증되었고, 최소 40분의 반응 시간 만으로도 증폭이 가능한 것으로 확인되었다.

무엇보다도 CBPV-LAMP는 실험실 내의 환경에서 검출뿐만 아니라 현장 적용에 초점을 맞추었다. 등은 증폭이라는 특징을 가지는 LAMP법을 도입함으로써 고가의 장비가 필요 없어 항온수조 등의 간단한 장비만을 가지고 CBPV검출이 가능함을 확인하였다. 또한 SYBR Green I을 이용함으로써 형광 발현을 통하여 증폭산물을 확인할 수 있어, 전기영동 과정을 생략 할 수 있어 더욱 간단한 진단이 가능함이 입증되었다. 다만 SYBR Green I은 UV하에서만 관찰이 가능하므로, 만일 육안으로 증폭산물을 확인 할 수 있는 방법이 좀 더 개발된다면 CBPV-LAMP는 현장에서의 CBPV검출에 매우 유용한 진단법으로 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

라 .적요

Chronic bee paralysis virus (CBPV)는 꿀벌 바이러스로 만성꿀벌마비병을 일으킨다. 본 연구에서는 현장에서의 신속한 CBPV 진단을 위하여 loop-mediated isothermal amplification법을 이용하여 1시간 내에 등온에서 검출 가능한 진단법을 개발하였으며, 이를 CBPV-LAMP법이라 명명하였다. CBPV의 일부를 특이적으로 증폭시키는 4개의 primer를 제작하였으며 최적 온도가 54°C임을 확인하고 최소 40분 내에 검출이 가능함을 확인하였다. 최적 조건을 바탕으로 4개의 primer가 1×10^4 copies 까지 검출하는 민감성을 확인할 수 있었다. 특히 본 연구에서 개발된 CBPV-LAMP법은 SYBR Green I을 이용하여 전기영동 과정 없이 바로 증폭 여부를 확인할 수 있는 방법을 모색하였으며, 이는 CBPV의 검출법의 현장 적용가능성을 높이는 결과라 할 수 있다. CBPV-LAMP법을 통하여 CBPV를 신속하고 정확하게 검출함으로써 현장에서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 6 절 BQCV 검색을 위한 신규 검출법의 개발

1. 초고속 PCR법을 이용한 Black Queen Cell Virus (BQCV) 신속 진단법 개발

가. 서론.

본 연구는 꿀벌의 병원성 바이러스인 Black Queen Cell Virus (BQCV)를 보다 신속히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, BQCV만이 보유하고 있는 특이 유전자인 ORF2 gene의 특이 159 bp를 검출목표로 하였다. BQCV의 검출을 위한 연구는 PCR을 기반으로 한 특이 유전자의 검색이 주종을 이루고 있으며, 본 연구는 이 검색법 중 가장 빠른 8분 34초에 30회전의 PCR을 마치고 판정을 할 수 있도록 하였다. 또한 본 연구는 BQCV에 대한 최초의 초고속 PCR법(Ultra-rapid PCR)을 적용한 검출법임을 밝히고, 이 내용은 Journal of Apiculture 26(3)에 “Development of Ultra-rapid Real-Time PCR Method for the detection of Black Queen Cell Virus”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) BQCV검출을 위한 Primer들의 위치 와 염기서열



Figure 1. The location of detection primers on BQCV genome.

Table 1. BQCV-specific Primer for ultra-rapid real-time PCR

Virus	Primer name	Primer sequence(5'→3')	PCR product (bp)	Reference
BQCV	BQCV-RT-F	TCG CAG AGT TCC AAA TAC CG	159	Yoo et al., 2008
	BQCV-RT-R	TAT CAT CTC CCG CAC CTA CC		

다. 결과 및 고찰

(1) BQCV검출을 위한 Primer들의 평가 및 선발

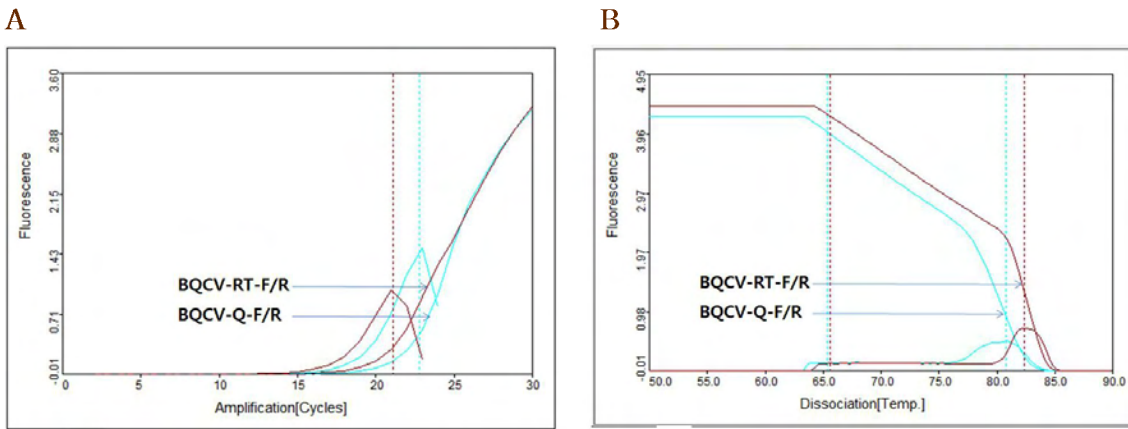


Figure 2. The primer selection for ultra-rapid real-time PCR. Panel A shows fluorescence curves of URRT PCRs with BQCV-RT-F/R and BQCV-Q-F/R primer sets. The highest specific and sensitive primer set was evaluated (BQCV-RT-F/R). The C_T values of each primer sets were 21.12 and 22.78, respectively. Panel B shows the melting analysis results of the same PCR products in the range of 50–90°C. All PCR products were identical and dependent on the midpoint temperature (T_m).

(2) BQCV검출을 위한 초고속 PCR의 최적 조건 확립

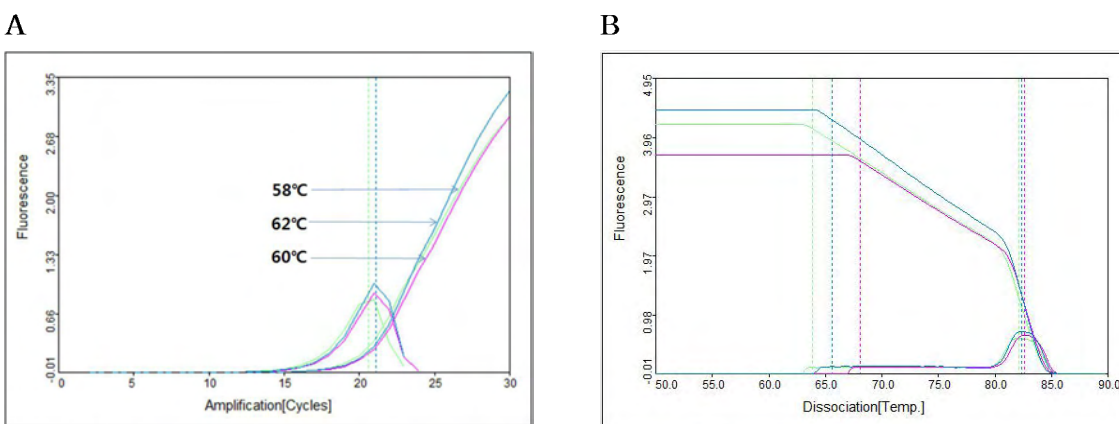
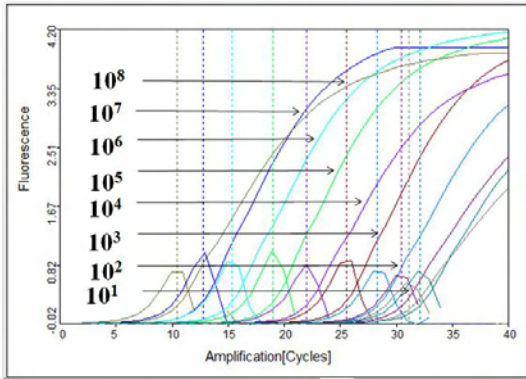


Figure 3. Optimal annealing temperature for the specific PCR using BQCV-RT-F/BQCV-RT-R primers pairs. PCR was performed under the following conditions: 94°C, 100sec pre-denaturation/ at 94°C for 10sec; 58–62°C for 10sec; 72°C for 10sec; 40cycles/ at 50–90°C for the melting temperature analysis. Panel A shows the fluorescence curves for the gradient URRT PCRs. Panel B shows the melting analysis result for the same PCR

products in the range of 50–90°C. All PCR products were identical and dependent on the midpoint temperature (T_m), calculated in the range of 82.05–82.58°C. The detection primer pairs showed the fastest C_T value at 62°C.

(3) BQCV-초고속 PCR의 민감도

A



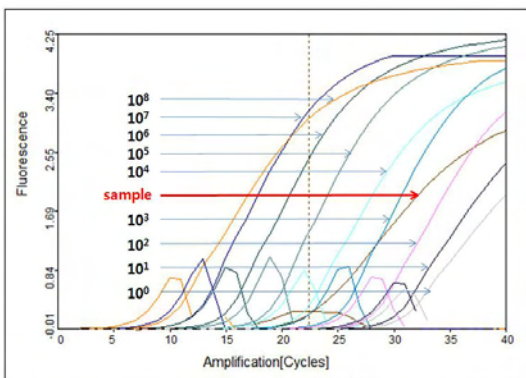
B

Initial template	Elapsed time	C_T value	T_m value
10^8 copies of pBX-BQCV	36:21	10.46	82.31
10^7 copies of pBX-BQCV	36:27	12.81	81.72
10^6 copies of pBX-BQCV	36:16	15.33	81.68
10^5 copies of pBX-BQCV	36:18	19.03	81.41
10^4 copies of pBX-BQCV	36:18	21.97	81.52
10^3 copies of pBX-BQCV	36:14	25.57	81.62
10^2 copies of pBX-BQCV	36:11	28.30	82.66
10^1 copies of pBX-BQCV	36:16	30.48	82.41
10^0 copies of pBX-BQCV	36:09	31.14	83.12
Negative control (D.W.)	36:07	32.14	83.37

Figure 4. Sensitivity test of the detection primer set with serially diluted pBX-BQCV. Each URRT PCR was performed under the standard conditions with different quantities of initial template DNA. Initial templates were used in the range of 10^8 to 10^0 copies of pBX-BQCV, respectively. Panel A shows the fluorescence curves for the sensitivity URRT PCRs. The C_T values showed the initial quantity of template-dependent manner in the range of 10^8 – 10^1 copies. Melting analysis of the same PCR products were performed in the range of 50–90°C. All PCR products were identical, dependent on the temperature of midpoint (T_m), calculated in range of $81.91 \pm 0.47^\circ\text{C}$ (data not shown). Panel A shows detection limit of BQCV-specific ultra-rapid real-time PCR using different quantities of initial template.

(4) 감염시료에 대한 BQCV-초고속 PCR 진단법의 적용

A



B

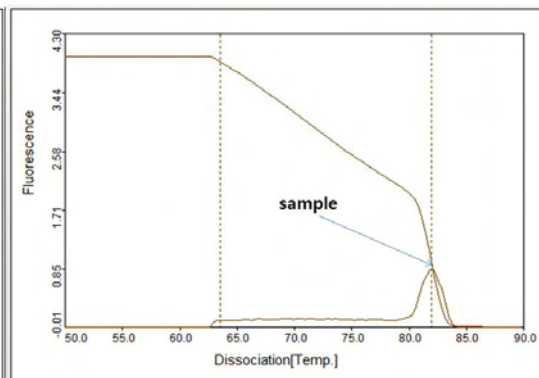


Figure 5. Application of ultra-rapid real-time PCR to BQCV-infected honeybee

sample. Confirmed PCR condition was applied to field sample with BQCV-URRT standard curve PCR. Panel A shows fluorescence intensity curves of BQCV-infected field sample. Panel B shows the result of melting analysis of the same PCR products in the range of 50–90°C. The temperature of midpoint (T_m) of PCR product was 81.91 which was included in $81.91 \pm 0.47^\circ\text{C}$.

(5) BQCV-초고속 PCR법의 최소 판정시간

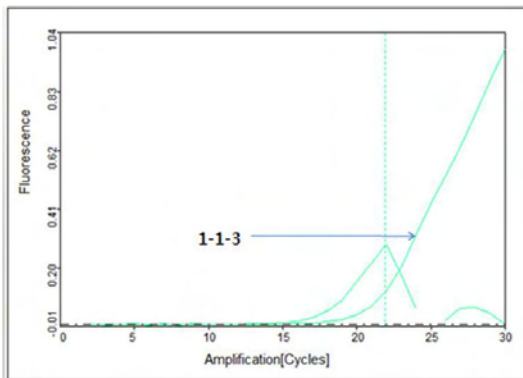


Figure 6. Minimal detection time confirmation using BQCV-infected cDNA in URRT PCR. Each reaction was performed in various conditions to reduce the detection time: denaturation and annealing temperature. At the condition of the shortest time (94°C for 1s, 62 for 1s, 72 for 3s), we confirmed the shortest detection time (8min 34sec).

2. 재조합 단백질의 발현을 통한 Black Queen Cell Virus 특이 항원의 생산

가. 서론

Black Queen Cell Virus (BQCV)는 picorna-like honeybee virus로 여왕벌 유충과 번데기의 사체에서 최초로 보고되었다(Bailey and Wood, 1977). 바이러스에 감염된 번데기의 세포벽 색이 어둡게 변하는 증상을 보이며, 오스트레일리아에서는 여왕벌 유충죽음의 가장 일반적인 원인으로 보고되어 있다(Anderson, 1993). BQCV는 유충과 성충에 모두 감염되며, 여왕벌 유충과 번데기의 사멸을 초래한다.

BQCV는 대부분의 꿀벌 바이러스 질병들과 같이 뚜렷한 증상이 알려져 있지 않아 감염을 인지하기 어려우며, 특별한 치료법이 개발되어 있지 않아 질병의 사전 예방과 효과적인 차단을 위해서는 정확한 진단이 절실히 필요한 실정이다. 또한, BQCV가 노제마와 연계되어 감염된

다는 보고(Allen and Ball, 1996; Bailey et al., 1983)는 그 혼합 감염의 피해의 측면에 주목되고 있으며, 양봉현장에서의 피해는 이러한 혼합 감염의 경우 피해가 보다 크게 확대될 것으로 추측되고 있다.

국내에서는 2007년도에 최초로 BQCV가 발견된 이후(유 등, 2007), 현재까지 매년 국내의 BQCV 감염 수준이 상당한 것이 확인되었다(유와 윤, 2009). 이에 양봉현장에서 간단하게 병원체의 존재를 확인할 수 있는 다양한 진단방법들이 연구되고 있다 (Notomi et al., 2000; 유 등, 2008; No et al., 2010).

그 동안 꿀벌의 바이러스 질병을 진단을 위해 reverse-transcriptase PCR을 이용한 많은 연구들이 수행되어졌으며(유 등, 2007; 이 등, 2005; Benjeddou et al., 2001; Genersch, 2005; Ribiere et al., 2002. Stoltz et al., 1995; Topley and Davison, 2005), 최근에는 real-time PCR을 이용한 연구들이 보고되어지고 있다 (Blanchard et al., 2007; Chen et al., 2005, Kukielka et al., 2008). 그러나 대부분의 진단법들이 실험실적 방법으로 실제 양봉 현장에서는 적용시키기에 어려운 부분이 많다.

따라서 본 실험에서는 양봉 현장에서 일차적으로 병원체를 진단할 수 있는 빠르고 간단한 래피드 키트를 개발하고자 하였으며, 이의 일환으로 BQCV structural polyprotein 항원 단백질의 대량 생산을 위하여 ELP 발현 system을 이용하였다. 사용된 ELP 발현 system을 통해 많은 단백질의 확보할 수 있었으며, ELP 를 이용한 ITC 정제를 통해서 고효율의 정제가 가능하며, 래피드 키트제작을 위한 대량 항원의 생산과 이를 통한 BQCV 및 다양한 병원체의 신속진단에 사용될 것으로 기대된다.

나. 재료 및 방법

(1) BQCV 발현용 primers의 제작

BQCV structural gene 부분의 발현을 위하여 primer를 제작하였다(Table 1). 이 primer는 AF183905의 7850nt-8550nt를 바탕으로 Primer3(Version 0.2, primer design software)를 사용하여 설계되었으며, 발현용 vector로의 삽입을 위하여 *Bam*HI과 *Sal*I restriction site를 포함시켰다. 설계된 primer의 위치를 Fig. 1에 나타내었으며, Oligonucleotide의 제작은 (주)바이오닉스(Bionics, Korea)에 의뢰하였다.



Figure 1. The location of primers on BQCV genome.

Table 1. Oligonucleotide primers for BQCV Real-Time PCR

Virus	Primer name	Primer sequence(5'→3')	PCR product (bp)	Reference
BQCV	BQCV-BamHI-F	GGA TCC TGG TCA GCT CCC ACT ACC TTA AAC	713	This study
	BQCV-Sal I-R	GTC GAC GCA ACA AGA AGA AAC GTA AAC CAC		

(2) 재조합 pQE30-BQCV-ELP vector 제작

본 실험에서는 BQCV 단백질의 대량 발현을 위하여 ELP fusion protein 발현 시스템을 이용하였다. ELP는 단백질 전사 시 Val-Pro-Gly-Val-Gly의 peptide 반복서열을 가지는 165bp의 인공합성 DNA를 사용하여 in vitro ligation을 통해 얻어진 약 1.8 kb의 polypeptide로 pQE30 vector의 MCS 부분에 삽입시킨 것이다. BQCV 유전자는 primer의 양쪽 끝에 설계된 *Bam*HI과 *Sal*I을 이용하여 ELP tagging vector에 삽입하였다.

(3) 재조합 vector의 염기서열 확인

BQCV 유전자의 발현을 위하여 확보된 713bp 부분의 염기서열 및 아미노산 서열을 확인하였다. 확보된 clone은 pQE30-BQCV-ELP라 명명하였으며, automatic sequencer를 통해 분석된 DNA 염기서열은 ClustalX program (1.81)을 사용하여 NCBI에 등록된 Black queen cell virus structural popyprotein (orf2) gene (Accession no. AF183905: 7850-8550)과 비교 분석하였다(Fig. 3, 4).

(4) pQE30-BQCV-ELP 발현

재조합 단백질의 단일 colony는 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 과 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin가 함유된 20 ml LB media에 접종되었으며, 180 rpm, 37°C에서 overnight 배양하였다. 배양액은 세 배지에 계 대하여 A600=0.5 까지 배양하였으며, 이 후, IPTG를 사용하여 발현을 유도하였다. 배양액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리를 수행하여 상등액을 제거하였으며, 침전된 세포는 1 ml 의 PBS (pH 7.4)로 부유하였다. sonicator를 사용하여 세포를 파괴시킨 후 (Amplitude 40%, Pulse 0.5 sec, 0.5 sec, Time 1 min 30 sec), SDS-PAGE gel 분석을 통해 BQCV-ELP 재조합 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질 분석을 위해 12% SDS-PAGE gel을 사용하였으며, 6 μl 의 세포와 5 \times probe buffer 혼합액을 100°C 에서 10 분간 boiling 시킨 후, stocking gel 에서 15 mA, separating gel 에서 30 mA로 전기영동을 수행하였다.

전기영동 후, polyacrylamide gel은 Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 gel staining solution을 사용하여 30-60 분간 염색을 수행하였으며, 이 후, Coomassie gel destaining solution로 탈염색하였다.

(가) 최적 IPTG 농도

IPTG (Isopropyl thio- β -D-galactoside) 농도에 따른 발현 효율을 확인하기 위하여 1차 계대배양 후, 0 mM, 0.1 mM, 0.3mM, 0.5mM, 1mM, 2mM 이 되도록 IPTG를 첨가한 후 6시간 동안 유도배양하였다.

(나) 최적 발현 유도 시간

Induction 시간에 따른 발현 효율을 확인하기 위하여, 0.3mM이 되도록 IPTG를 첨가한 후, 2 hr, 4 hr, 6 hr, 8 hr, 10 hr, 12 hr, 24 hr 의 조건에서 유도 배양을 하였다.

다.결과 및 고찰

(1). 재조합 pQE30-BQCV-ELP vector 제작

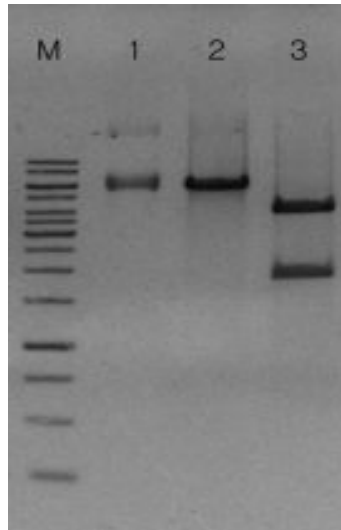


Figure 2. Restriction analysis of pQE30-BQCV-ELP and genetic map of pQE30-BQCV-ELP. Lane M is the 1 kb ladder size marker(10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3.5 kb, 3 kb, 2.5kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500bp, 250 bp); lane 1, plasmid DNA of pQE30-BQCV-ELP; lane 2, pQE30-BQCV-ELP digested by SacI (5.887 kb); lane 2, pQE30-BQCV-ELP digested by SacI and HindIII (1.967 kb, 3.920 kb).

(2) 재조합 vector의 염기서열 확인

BQCV 유전자의 발현을 위하여 재조합 pQE30-BQCV-ELP의 염기서열을 확인하였다. 그 결과 BQCV 전체 염기서열 (7850-8550 in AF183905)과 뉴클레오타이드 서열이 99% 일치하였으며, 아미노산 서열에서 100%의 상동성을 확인하였다.

AF183905	tggtcagctcccactaccttaaacatagtgccggagatgtatgcgctttatcgaggagga
pQE30-BQCV-ELP	tggtcagctcccactaccttaaacatagtgccggagatgtatgcgctttatcgaggagga
AF183905	gttcgagttaaagtgttactgagaagggtgtggatttcgtcagagctaccgtagtcct
pQE30-BQCV-ELP	gttcgagttaaagtgttactgagaagggtgtggatttcgtcagagctaccgtagtcct
AF183905	caacagacttacggcagtgaagtcgctcctactactcatatcagtactcctttggcaata
pQE30-BQCV-ELP	caacagacttacggcagtgaagtcgctcctactactcatatcagtactcctttggcaata
AF183905	gaacaaataacctataaaaggagtcgcagagttccaaataccgtactatgctccatgtttg
pQE30-BQCV-ELP	gaacaaataacctataaaaggagtcgcagagttccaaataccgtactatgctccatgtttg
AF183905	tcatcttcgtttagagcgaattcggaaacatcttactatagttcaggtcggaaataatctc
pQE30-BQCV-ELP	tcatcttcgtttagagcgaattcggaaacatcttactatagttcaggtcggaaataatctc
AF183905	gatatagccacttcacctccttccatcaatcgctattatgcggtaggtgcgggagatgat
pQE30-BQCV-ELP	gatatagccacttcacctccttccatcaatcgctattatgcggtaggtgcgggagatgat
AF183905	atggacttttccatctttatcggtagccgccctgtattcatgcatctcagacggcccag
pQE30-BQCV-ELP	atggacttttccatctttatcggtagccgccctgtattcatgcatctcagacggcccag
AF183905	tttacaaaataaaacaaggtaaagtgtatgatttgaggatgatcagta ^c gacctttc
pQE30-BQCV-ELP	tttacaaaataaaacaaggtaaagtgtatgatttgaggatgatcagta ^t gacctttc
AF183905	aggggaagtccaggacggtagcggctttctcaatgctcgtagtattgaggatagcgtttg
pQE30-BQCV-ELP	aggggaagtccaggacggtagcggctttctcaatgctcgtagtattgaggatagcgtttg
AF183905	ttgtgagctccttttagaggagggtcactttatctattgcttaaatcggttaagccacaa
pQE30-BQCV-ELP	ttgtgagctccttttagaggagggtcactttatctattgcttaaatcggttaagccacaa
AF183905	atthttctaagtgtcatgagtttcttctcgggttcttctcatgattactaatcgaaccgtg
pQE30-BQCV-ELP	atthttctaagtgtcatgagtttcttctcgggttcttctcatgattactaatcgaaccgtg
AF183905	tgtagagtcagaatggttggtttacgttttcttctgttgc
pQE30-BQCV-ELP	tgtagagtcagaatggttggtttacgttttcttctgttgc

Figure 3. DNA sequence homology between AF183905 and pQE30-BQCV-ELP. pQE30-BQCV-ELP indicates nucleotides from BQCV Korean strains in this study. The sequence determined is corresponding to nucleotides in 7850–8550 of AF183905 (the complete BQCV sequence deposited in GenBank database). Identical residues indicated in the consensus line with a stick (!). Nucleotide sequence was aligned to AF183905 revealing 99% homology.

AF183905	WSAPTTLNIVAEMYALYRGGVRVKVVTEKGVDFVRATVSPQQTGSEVAPTTHISTPLAI
pQE30-BQCV-ELP	WSAPTTLNIVAEMYALYRGGVRVKVVTEKGVDFVRATVSPQQTGSEVAPTTHISTPLAI
AF183905	EQIPIKGVAEFQIPYYAPCLSSSFRANSETFYSSGRNNLDIATSPPSINRYAVGAGDD
pQE30-BQCV-ELP	EQIPIKGVAEFQIPYYAPCLSSSFRANSETFYSSGRNNLDIATSPPSINRYAVGAGDD
AF183905	MDFSIFIGTPPCIHASQTAQFTKIKQGKVVYDLRYDQYDPFREVQDGTAFLNARSIEDSDL
pQE30-BQCV-ELP	MDFSIFIGTPPCIHASQTAQFTKIKQGKVVYDLRYDQYDPFREVQDGTAFLNARSIEDSDL
AF183905	L
	L
pQE30-BQCV-ELP	L

Figure 4. Amino acid sequence homology between AF183905 and pQE30-BQCV-ELP. pQE30-BQCV-ELP indicates amino acid sequence from BQCV Korean strains in this study. The determined DNA sequence in this study was translated into amino acid sequence and compared with amino acid sequence from nucleotides in 7850-8550 of AF183905 (the complete BQCV sequence deposited in GenBank database). Amino acid sequence was aligned to AF183905 revealing 100% homology.

(3) pQE30-BQCV-ELP의 발현

(가) pQE30-BQCV-ELP의 발현 확인

BQCV-ELP 발현의 확인은 사용된 pQE30-ELP 의 확립된 발현조건으로 수행하였다 (한 등, 2006). 재조합 단백질의 overnight 배양액을 배지에 계대하여 A600=0.5 까지 배양하였으며, 이후, 0.5 mM의 IPTG를 사용하여 발현을 유도하였다. BQCV-ELP의 분자량은 81 kDa으로 molecular weight calculator program을 사용하여 측정하였으며, Figure 5에서 재조합 단백질의 발현을 확인하였다 (lane 2).

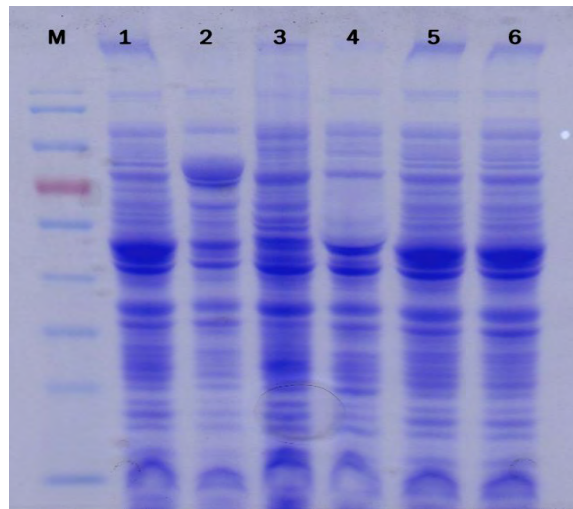
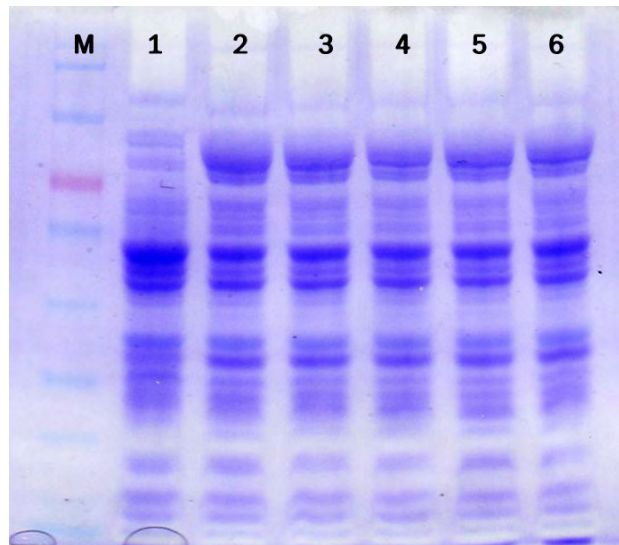


Figure 5. Expression of pQE30-BQCV-ELP in M15 by IPTG. SDS-PAGE was performed with 12% polyacrylamide gel and 1×TGS (Tris/Glycine/SDS) running buffer. All sample was loaded after sonication and heat denaturation. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1 and 2, total cell lysate of pQE30-BQCV-ELP 0mM and 0.5m, respectively; lane 3 and 4, total cell lysate of pQE30-ELP and pQE30-ELP induced at IPTG 0.5 mM, respectively; lane 5 and 6, total cell lysate of M15.

(나) 최적 IPTG 농도

IPTG 농도에 따른 발현 효율을 확인하기 위하여 각기 다른 IPTG 농도에서 단백질 발현을 유도하였다. 그 결과 IPTG에 의해 발현이 유도된 조건에서 발현된 pQE30-BQCV-ELP의 band를 확인할 수 있었다. IPTG의 농도가 0.3 mM 일 때 까지는 단백질 발현 양이 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 발현양이 감소하는 결과를 보였다. 발현양의 정확한 비교를 위하여 IPTG 농도에 따른 효율은 image analysing system을 사용하여 수치화하여 비교하였다 (Fig. 6.).



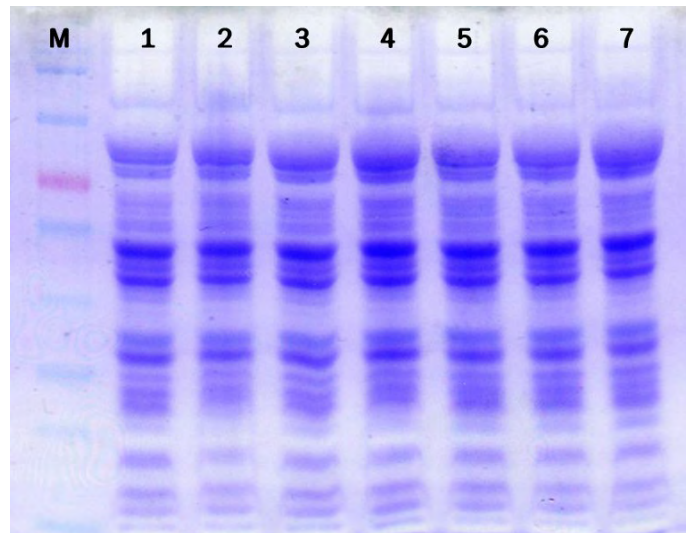
Lane	1	2	3	4	5	6
IPTG (mM)	0	0.1	0.3	0.5	1	2
Density	8.581543	32.86241	37.4425	24.53377	30.50379	24.96145

Figure 6. Expression of pQE30-BQCV-ELP in M15 with different IPTG concentration. SDS-PAGE was performed with 12% polyacrylamide gel and 1×TGS (Tris/Glycine/SDS) running buffer. All sample was loaded after sonication and heat

denaturation. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, 0 mM; lane 2, 0.1 mM; lane 3, 0.3 mM; lane 4, 0.5 mM; lane 5, 1 mM; lane 6, 2 mM, respectively.

(다) 최적 발현 유도 시간

Induction 시간에 따른 발현 효율을 확인하기 위하여, 이전의 실험에서 최적 IPTG 농도로 확인된 0.3mM이 되도록 IPTG를 첨가한 후, 각기 다른 induction 시간을 주어 단백질 발현을 유도하였다. 6 hr 까지는 induction 시간이 증가할수록 단백질 발현양이 증가하였으나, 이후에는 발현양에 큰 차이를 보이지 않다가 10 hr 이상이 되면 발현양이 줄어드는 결과를 보였다. 발현양의 정확한 비교를 위하여 발현 유도 시간에 따른 효율은 image analysing system을 사용하여 수치화하여 비교하였다 (Fig. 7.).



Lane	1	2	3	4	5	6	7
Time	2	4	6	8	10	12	24
Density	20.94086	22.58633	35.63238	34.97445	31.2241	27.90302	20.57064

Figure 7. Expression of pQE30-BQCV-ELP in M15 with different induction time. SDS-PAGE was performed with 12% polyacrylamide gel and 1×TGS (Tris/Glycine/SDS) running buffer. All sample was loaded after sonication and heat denaturation. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa,

17kDa, 10kDa). Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, 2 hr; lane 2, 4 hr; lane 3, 6 hr; lane 4, 8 hr; lane 5, 10 hr; lane 6, 12 hr; lane 7, 24 hr, respectively.

(라) Inclusion body의 해리

BQCV-ELP 재조합 단백질의 발현 형태를 확인하기 위하여, 배양액을 3,000 rpm 에서 15분간 원심분리하여 상등액과 침전된 protein을 분리하였으며 SDS-PAGE gel 분석을 수행하였다. 그 결과 BQCV-ELP fusion protein 은 가용성과 불용성의 형태로 확인되었다 (Fig. 8.). Inclusion body 형태로 발현된 단백질을 해리하기 위하여 음전하를 띄어 단백질의 denaturation을 유도하는 SDS를 사용하였다. 1%의 SDS를 첨가하여 10분동안 끓인 후, 상온에서 식혀 inclusion body를 해리시켰다 (Fig. 9.) 그 결과 대부분의 발현 단백질이 상등액에서 확인되었다.

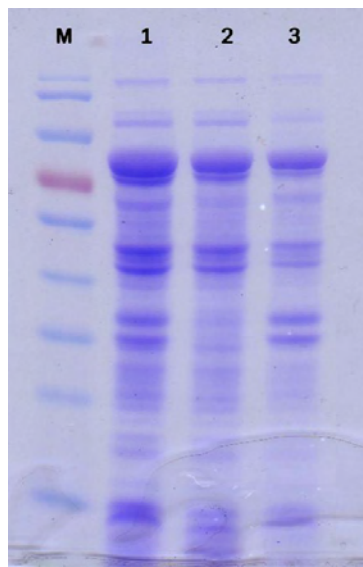


Figure 8. Identification of BQCV-Thr-ELP in inclusion bodies. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, total cell lysate of pQE30-BQCV-ELP IPTG 0.5 mM; Lane 2, supernatant of pQE30- BQCV-ELP induced at IPTG 0.5 mM, after centrifugation. Lane 3, pellet of pQE30-BQCV-ELP induced at IPTG 0.5 mM after centrifugation.

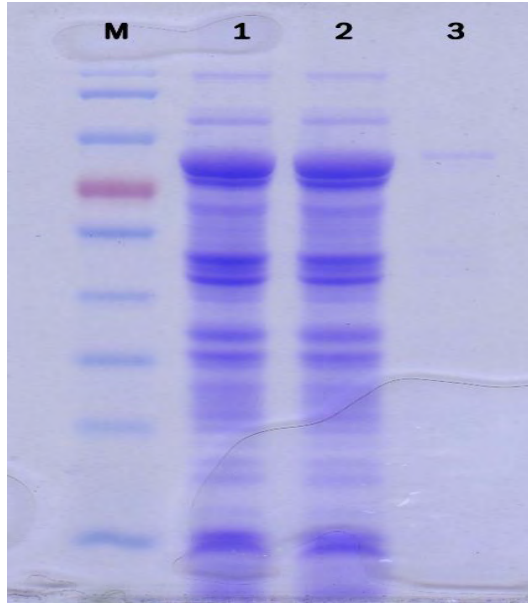


Figure 9. Isolation of inclusion bodies using the 1% of SDS. 1 % final concentration of SDS was added to pQE30-BQCV-ELP induced at IPTG 0.5 mM and boiled for the denaturation of inclusion bodies. Then, the boiled sample was centrifuged for separation of supernatant from the insoluble proteins. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, total cell lysate of pQE30-BQCV-ELP IPTG 0.5 mM; Lane 2, supernatant of boiled sample containing pQE30-BQCV-ELP protein that was a soluble form; lane 3, pellet of boiled sample containing insoluble proteins.

3. ITC법에 의한 재조합 Black Queen Cell Virus 특이 항원의 정제

가. 서론.

본 연구는 재조합 Black Queen Cell Virus (BQCV) 단백질 항원의 정제를 위하여 ITC (Inversed transition cycling)법을 적용한 새로운 정제법을 개발한 것이다. ITC는 ELP (Elastin-like Polypeptide)의 온도 변이성을 이용하여 액체 내에서 ELP의 선택적 고체화를 유도하는 방법으로, 본 연구에서는 recombinant BQCV-ELP 융합 유전자를 발현시켜, 이의 융합 단백질을 만들고, 대장균 extract에 온도변화를 주어 선택적으로 이 Fusion-protein을 침전 정제한 것이다.

본 연구는 Journal of Apiculture 27(1)에 “Purification of Recombinant Protein of Black Queen Cell Virus ” 의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법.

(1) BQCV특이 항원을 위한 ELP융합단백질 발현용 벡터

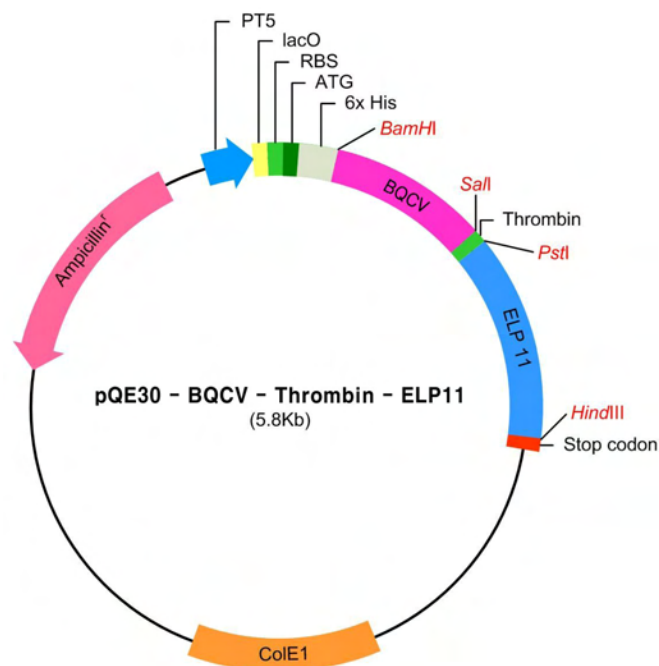


Figure 1. Genetic map of pQE30-BQCV-ELP. QE30-BQCV-ELP (Yoo et al., 2011) vector originates from pQE30, prokaryotic expression vector. Total size is 5.887 Kb and Ampicillin R represents ampicillin resistance gene. *ColE1* represents *E. coli* origin and has 6X His-tag sequence.

(2) ITV-정제법의 원리

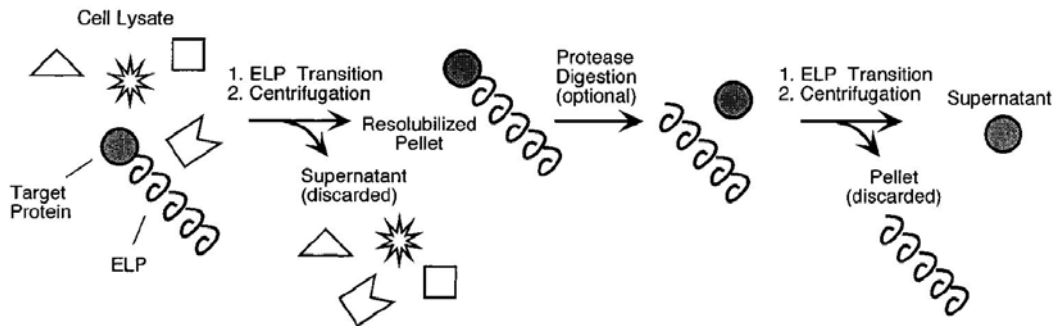


Figure 2. The principle of inverse transition cycling (ITC) purification. The ELP fusion protein is separated from other contaminating biomolecules in the cell lysate by triggering the inverse temperature phase transition of the ELP. The inverse phase transition of the ELP fusion is triggered by an increase in temperature and / or ionic strength, and aggregated protein is separated by centrifugation leaving the contaminating biomolecules largely in the soluble fraction. The ELP fusion protein is then resolubilized in fresh buffer by cooling to below its T_t (transition temperature). If desired, the target protein can be liberated from the fused ELP tag by cleavage at the thrombin recognition site engineered between the ELP tag and the target protein. The cleaved ELP can be removed by another round of ITC. After centrifugation, the purified target protein is obtained in the supernatant, while the aggregated ELP is discarded in the pellet (Meyer et al., 2001).

다. 결과 및 고찰.

(1) ITC법에 의한 ELP융합-BQCV특이 항원의 정제

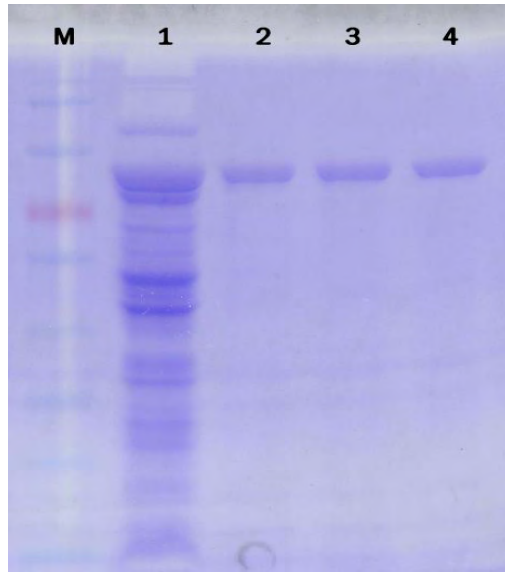


Figure 3. Purification of pQE30-BQCV-ELP fusion protein by ITC. The final concentration of 1.3 M NaCl was added and ITC purification of ELP fusion protein was performed. ITC purification was repeated twice more. Lane M, protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). lane 1, purified pQE30-BQCV-ELP by one round of ITC; lane 2, purified pQE30-BQCV-ELP by two round of ITC; Lane 3, purified pQE30-BQCV-ELP by three round of ITC.

(2) 정제된 ELP융합-BQCV특이 항원에서 ELP의 제거

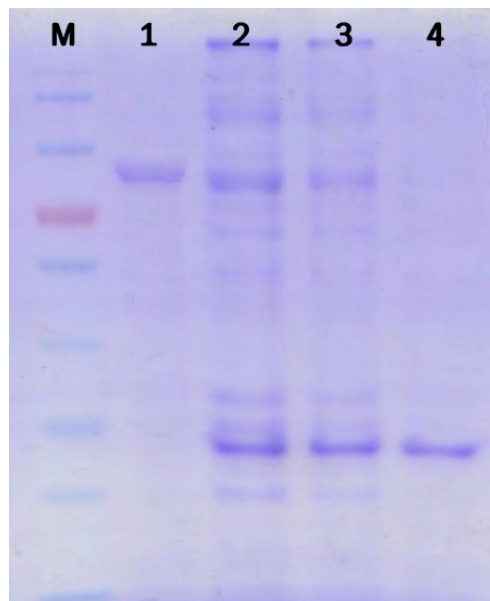


Figure 4. Purified BQCV protein after cleavage with thrombin. Purified BQCV was obtained after cleavage of BQCV-ELP-fusion protein by thrombin at the recognition site

located between BQCV and ELP tag, followed by another round of ITC to remove the ELP tag from solution. Molecular weight of purified BQCV protein is 26kDa. Lane M is protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, BQCV-ELP fusion protein after ITC purification; lane lane 2, 3, BQCV-ELP fusion protein after cleavage with thrombin. lane 4, purified of BQCV protein by ITC purification after cleavage with thrombin.

(3) ITC법과 HIS-tag법의 비교

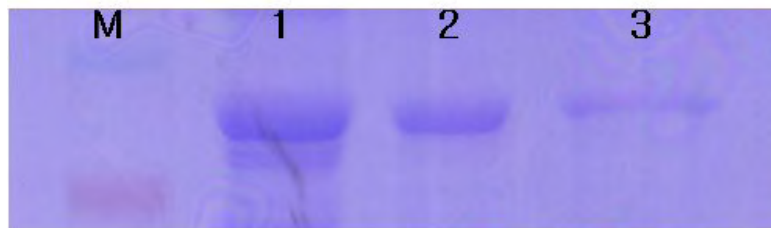


Figure 5. Comparison of purification method between ITC and His-tag. Lane M is protein size marker (170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 55 kDa, 40 kDa, 35, 25 kDa, 17kDa, 10kDa). Lane 1, BQCV-ELP fusion protein; lane 2, BQCV-ELP fusion protein after ITC purification; lane 3, BQCV-ELP fusion protein after His-tag purification.

제 7 절 DWV 검색을 위한 초고속 PCR 검출법의 개발

1. 초고속 PCR법을 이용한 DWV (Deformed Wing Virus) 신속 진단법 개발

가. 서론.

본 연구는 꿀벌의 병원성 바이러스인 DWV (Deformed Wing Virus) 를 보다 신속히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, DWV만이 보유하고 있는 특이 유전자인 RdRP gene의 특이 133 bp를 검출목표로 하였다. DWV의 검출을 위한 연구는 PCR을 기반으로 한 특이 유전자의 검색이 주종을 이루고 있으며, 본 연구는 이 검색법 중 가장 빠른 10분 11초에 30회 전의 PCR을 마치고 판정을 할 수 있도록 하였다. 또한 본 연구는 DWV에 대한 최초의 초고속 PCR법 (Ultra-rapid PCR)을 적용한 검출법임을 밝히고, 이 내용은 Journal of Apiculture 28(2)에 “Rapid and Sensitive detection of Deformed Wing Virus (DWV) in honeybee using ultra-rapid real-time PCR”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) DWV-특이 초고속 PCR (Ultra-Rapid PCR)에 사용된 Primer 염기서열

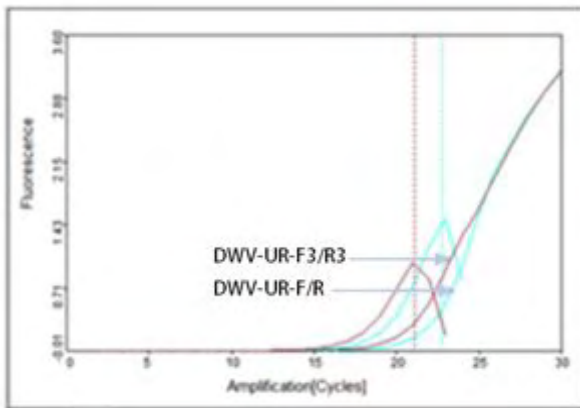
Table 1. Oligonucleotide primers for DWV-specific real-time PCR

Template	Primer Name	Primer sequences (5' → 3')	Position in NC004830	Product (bp)
pBX-DWV	DWV-UR-F	TGTCCGAAAGTTGTCGAAAGAA	6949	71bp
	DWV-UR-R	CACCACAAGGAACAGATAAATTAATC	-7019	
	DWV-UR-F3	GTTGTTTGAGAACCCAACTTG	7072	133bp
	DWV-UR-R3	CGCTTGCAACCACACTTCA	-7204	

다. 결과 및 고찰

(1) DWV-특이 초고속 PCR을 위한 Primer쌍의 평가 및 선발

A



B

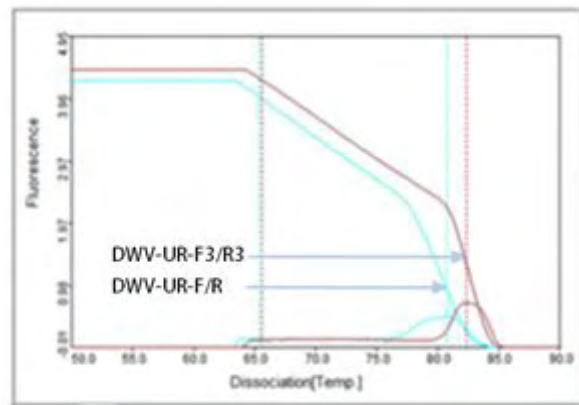
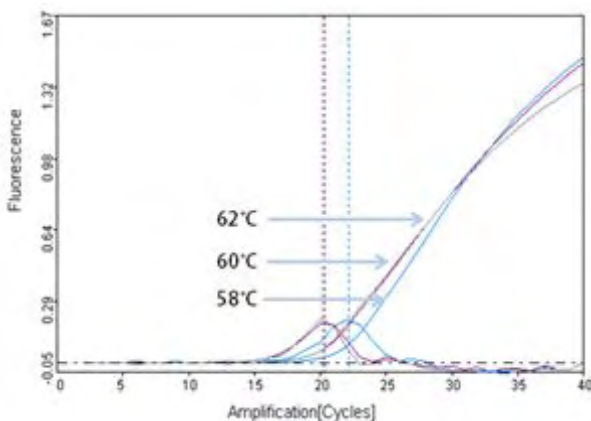


Figure 1. Primer selection for ultra-rapid real-time PCR

Panel A shows fluorescence curves of UR-RT PCRs using DWV-UR-F/R and DWV-UR-F3/R3 primer sets. The most specific and sensitive primer set was evaluated (DWV-UR-F3/R3). The C_T values of each primer sets were 21.15 and 22.57, respectively. Panel B shows the melting analysis results of the same PCR products in the range of 50–90°C. All PCR products were identical and dependent on the midpoint temperature (T_m).

(2) DWV-특이 초고속 PCR을 위한 최적 조건

A



B

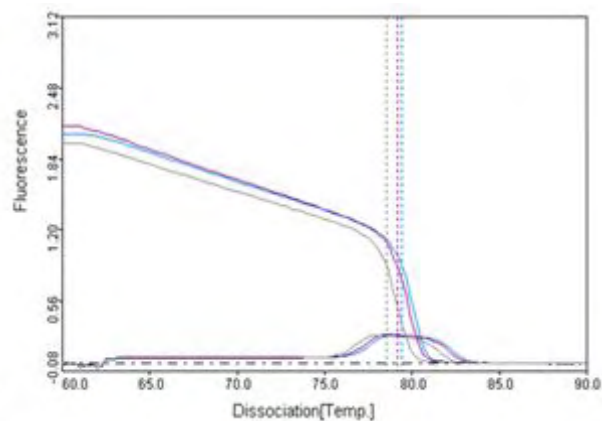


Figure 2. Optimal annealing temperature for specific PCR using DWV-UR-F3/DWV-UR-R3 primer pairs. PCR was performed under the following conditions: 94°C, 100sec pre-denaturation/ 94°C, 10sec; 58~62°C, 10sec; 72°C 10sec with 30cycles/ 60~90°C melting temperature analysis. Fluorescence curves for the gradient URRT PCRs shows no significant differences (Panel A) as well as the result of the melting analysis for the same PCR products in the range of 60~90°C (Panel B). All PCR products were identical and dependent on the midpoint temperature (T_m), calculated to be in the range of

79.11~79.40°C. The detection primer pairs showed the fastest C_T value, 20.18 at 60°C.

(3) DWV-특이 초고속 PCR의 민감도

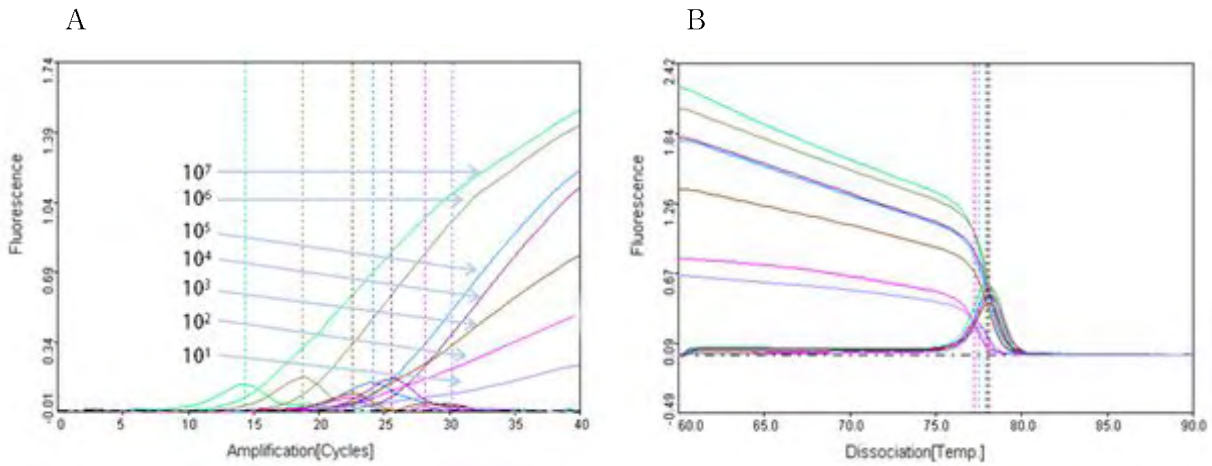


Figure 3. Sensitivity test of the detection primer set with serially diluted pBX-DWV479. Each URRT - PCR was performed under standard conditions with different quantities of the initial template DNA. Initial templates were used in the range of 10^7 to 10^1 copies of pBX-DWV479, respectively. The C_T values showed the initial quantity in a template-dependent manner in the range of $10^7 \sim 10^1$ copies. Panel A shows the fluorescence intensity curves of template-limit diluted URRT PCRs. Panel B shows the result of a melting analysis of the same PCR products in the range of 60~90°C. All PCR products were identical, and dependent on the midpoint temperature (T_m) calculated in range of 77.89~78.09°C.

(4) DWV-특이 초고속 PCR에서 초기 기질의 양과 C_t 값

Table 2. Representative C_T and T_m values of DWV ultra-rapid real-time PCR in range of $10^7 \sim 10^1$ copies

Initial template	Elapsed time	C_T value	T_m
10^7 copies of pBX-DWV479	22:41	14.32	77.89
10^6 copies of pBX-DWV479	22:46	18.79	78.07
10^5 copies of pBX-DWV479	22:16	22.56	77.97
10^4 copies of pBX-DWV479	22:35	24.15	77.95
10^3 copies of pBX-DWV479	22:39	26.08	78.09
10^2 copies of pBX-DWV479	22:33	28.13	77.94
10^1 copies of pBX-DWV479	22:14	30.21	77.93

(5) 감염시료에 대한 DWV-특이 초고속 PCR의 적용

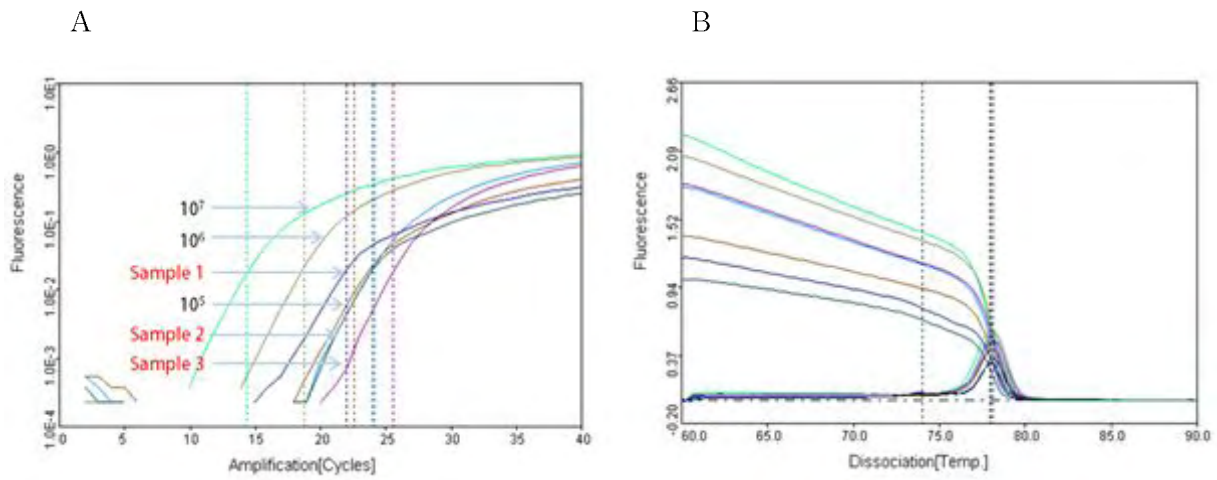
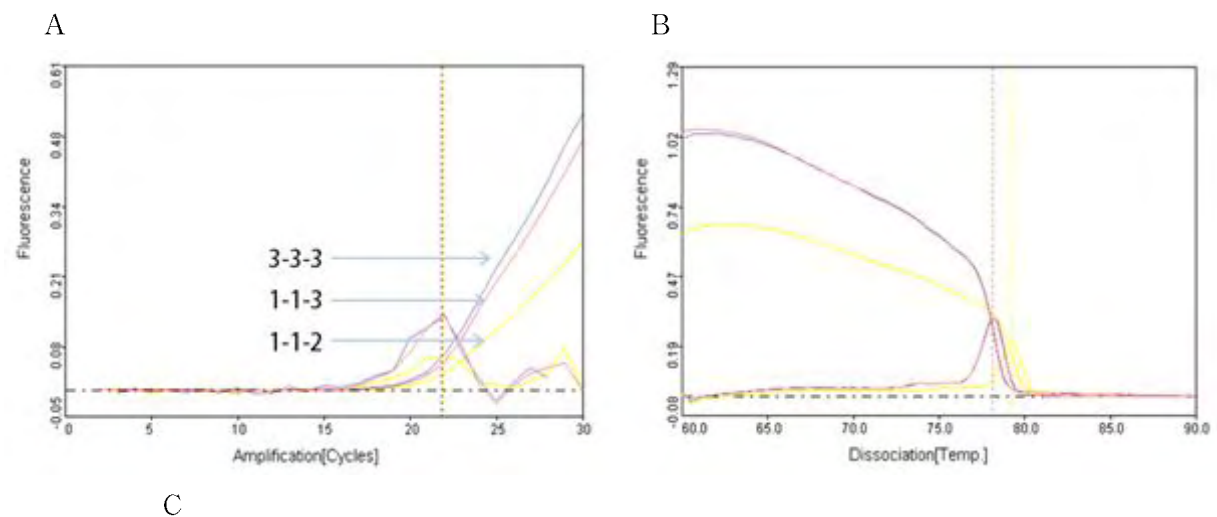


Figure 4. DWV detection using URRT PCR in cDNA from DWV-infected honeybee samples. The confirmed PCR conditions were applied to DWV-URRT PCR using cDNA from DWV-infected honeybee samples to determine DWV infection. DWV-infected samples were successfully detected in standard range of 10^2 - 10^5 copies of pBX-DWV clone (PanelA). In which indicated that the quantities of the loaded virus were calculated to be around 1×10^2 to 1×10^5 . All PCR products were identical dependent on the temperature of mid point (T_m) (PanelB).

(6) DWV-특이 초고속 PCR의 최소 판정시간



Amplification conditions	Elapsed time	C_T value	T_m
3-3-3	10:22	21.80	78.07
1-1-3	10:11	21.82	78.09
1-1-2	11:27	22.01	79.17

Figure 5. Minimal detection time confirmation using DWV - infected DNA in URRT PCR. To examine the minimal detection time, URRT PCR was performed in various

conditions to reduce the detection time: denaturation, annealing, and elongation time. The conditions of cycling was as follows; 30 cycles at 94°C for 10-1s, at 60°C for 10-1s, and at 72°C for 10-2s with pre-denaturation at 94°C for 15s. At the condition of the cycling as 94°C for 1s, 60°C for 1s, 72°C for 3s the shortest detection time, 10min 11sec including melting temperature analysis, was confirmed (Panel A, C). Almost amplicons after reaction were identical dependent on the melting temperature (T_m) (Panel B).

(7) DWV-특이 초고속 PCR의 특이성

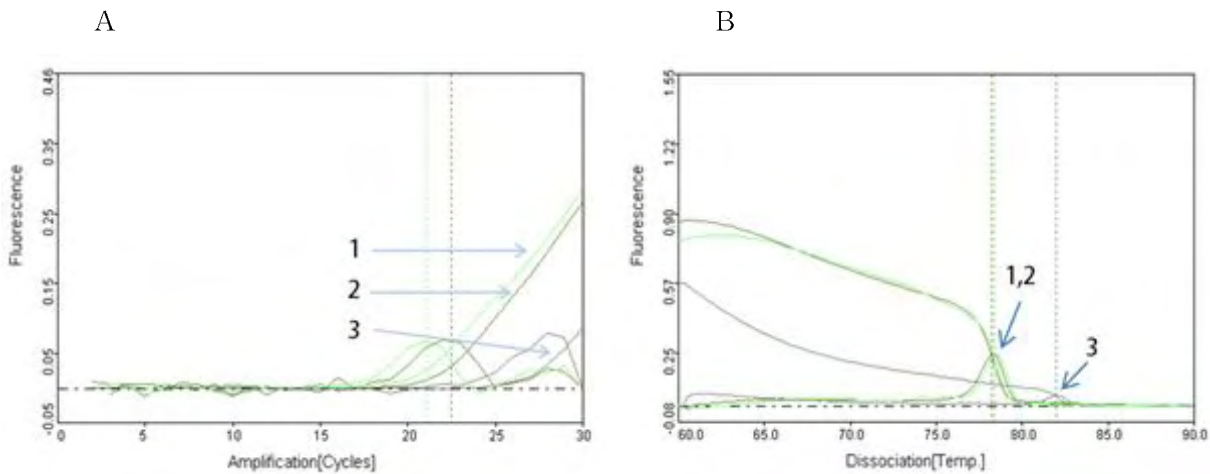


Figure 6. Specificity of PCR-primer pairs (DWV-UR-F3 / DWV-UR-R3) for DWV-specific detection. Synthesized cDNA from DWV, KBV infected honey bees was tested using by ultra-rapid real-time PCR with DWV-specific primer set. The DWV-specific amplicon was produced only from DWV-infected honey bees whereas KBV-infected sample was amplified no accurate amplicons after 30cycles as shown as in fluorescence curves and melting point analysis (Panel A and B).

Table 3. The values of CT and T_m of DWV ultra-rapid real-time PCR in specificity inspection

Initial template	Graph No.	Elapsed time	C _T value	T _m
cDNA from DWV-infected honeybee 1	1	11:21	22.46	78.21
cDNA from DWV-infected honeybee 2	2	10:59	21.01	78.41
cDNA from BQCV, IAPV-infected honeybee	3	11:30	N/A	81.90

제 8 절 SBV와 kSBV 검색을 위한 신규 검출법의 개발

1. 초고속 PCR법을 이용한 SBV (Sacbrood Virus) 신속 진단법 개발

가. 서론.

본 연구는 꿀벌의 병원성 바이러스인 SBV (Sacbrood Virus)를 보다 신속히 검출하고자 하는 목적으로 신규 개발한 것으로, SBV만이 보유하고 있는 특이 유전자인 RdRP gene의 특이 유전자를 검출목표로 하였다. SBV의 검출을 위한 연구도 PCR을 기반으로 한 특이 유전자의 검색이 주종을 이루고 있으며,

본 연구는 이 검색법 중 가장 빠른 17분만에 40회전의 PCR을 마치고 최고의 민감도하에서 판정을 할 수 있도록 하였다. 또한 본 연구는 최초의 역전사 초고속 PCR법(Reverse transcription Ultra-rapid PCR)을 소개하였고, 이를 통하여 5분이내의 역전사반응과 17분 PCR (40회전)을 결합시켜 시료로부터 22분만에 특이 염기서열을 증폭시킬 수 있음을 보여 주었다.

이 내용은 Journal of Virological Methods, 179(1):195-200 (2012)에 “Rapid detection of Sacbrood Virus (SBV) in Honeybee using Ultra-rapid real-time PCR (URRT-PCR)”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

본 보고서의 SBV-URRT-PCR에 사용된 Primer들은 SBV3-824F (5'-atc cag cgc gtc ttg agt t-3'; 6336 - 6354 in AF092924) 와 semi-136R (5'-gaa tca agg ggt ggg tgt tc-3'; 6452 - 6471 in AF092924)이며, 계산된 증폭산물의 크기는 136 bp 이었다. 최적조건을 설정하기 위한 표준 template는 pBX-SBV3.8 (GenBank accession number GQ160517, Nguyen *et al.*, 2008) 이었다.

이 재조합 DNA는 forward primer SBV3-824F (5'-atc cag cgc gtc ttg agt t-3'; 6336 - 6354 in AF092924)과 reverse primer SBV3-824R (5'-act ggg tcc ttc cca atc tt-3'; 7135 - 7154 in AF092924)의 RT-PCR로 생긴 PCR산물을 클론화한 것이다.

나. 결과 및 고찰

(1) 역전사반응시간과 초고속 PCR에서 Ct값의 변화

Table 1. URRT PCR with differently synthesized cDNA by incubation time

Incubation time of Reverse transcription	Ct valus A*	Ct valus B* ⁸
0 min	-	-
1 min	27.5	31
5 min	22	25.5
10 min	19	25
20 min	18	24
40 min	18.3	23
60 min	18	23

* synthesized cDNA used directly

** synthesized cDNA stored for 7 days

(2) 초고속 PCR에서 initial template의 양과 Ct값의 관계

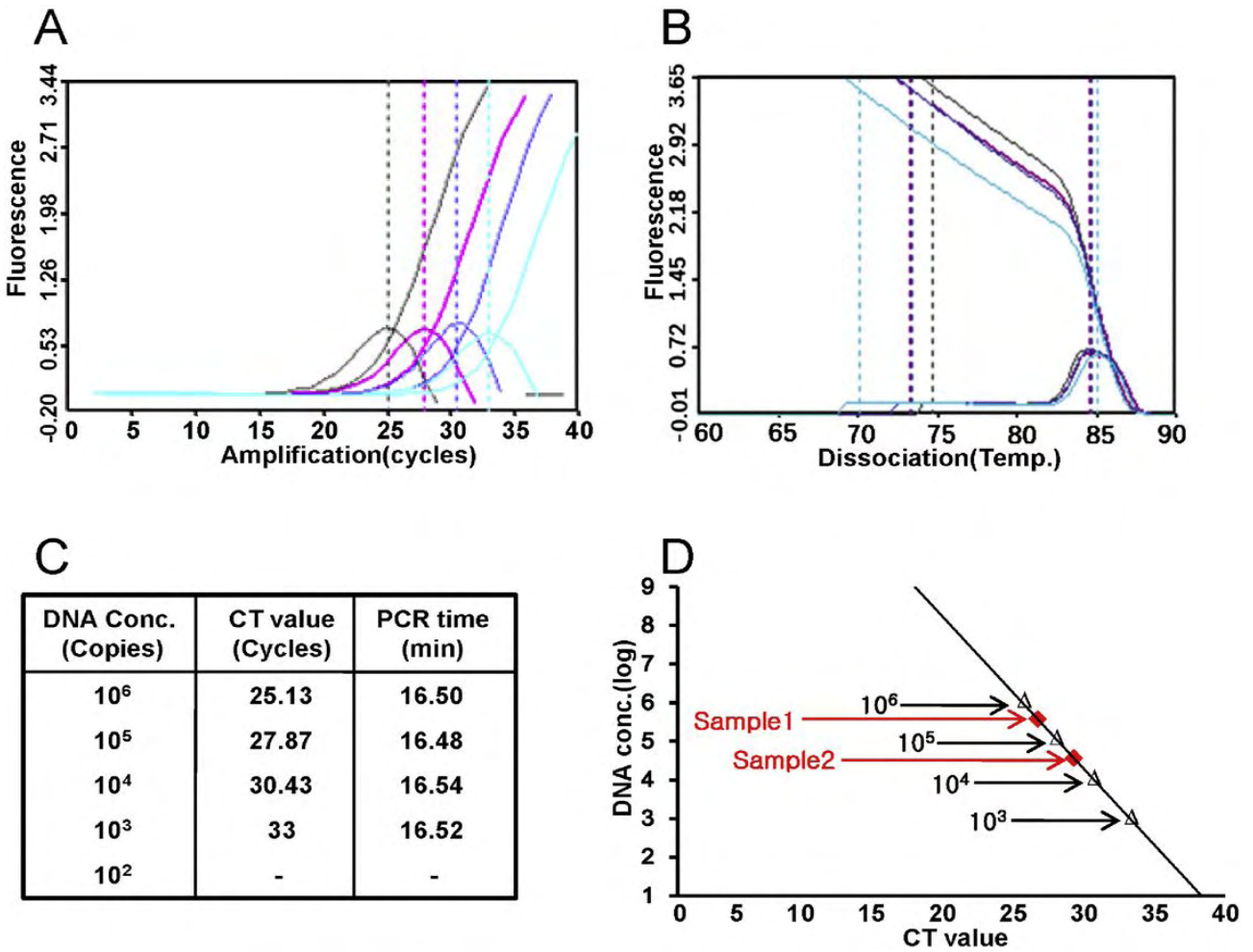


Fig 1. SBV URRT PCR for standard curve.

For the standard curve, a series dilution of plasmid pBX-SBV3.8 from 10^6 - 10^3 was used as the template for Ultra-rapid Real-time PCR using the primer pair, SBV3-824F/Semi-136R. A. Fluorescent intensity of the PCR product. B. The melting temperature analysis of initial templates in the range of 10^6 to 10^3 copies of pBX-SBV3.8. C. The C_T value and elapsed time. D. Regression analysis of PCR products. The linear relationship between the quantities of initial template and C_T values was fairly accepted. Regression equation was calculated as $Y=-0.382X+15.62$. Regression coefficient was $R^2=0.999$.

(3) 역전사반응시간에 따른 초고속 PCR의 변화

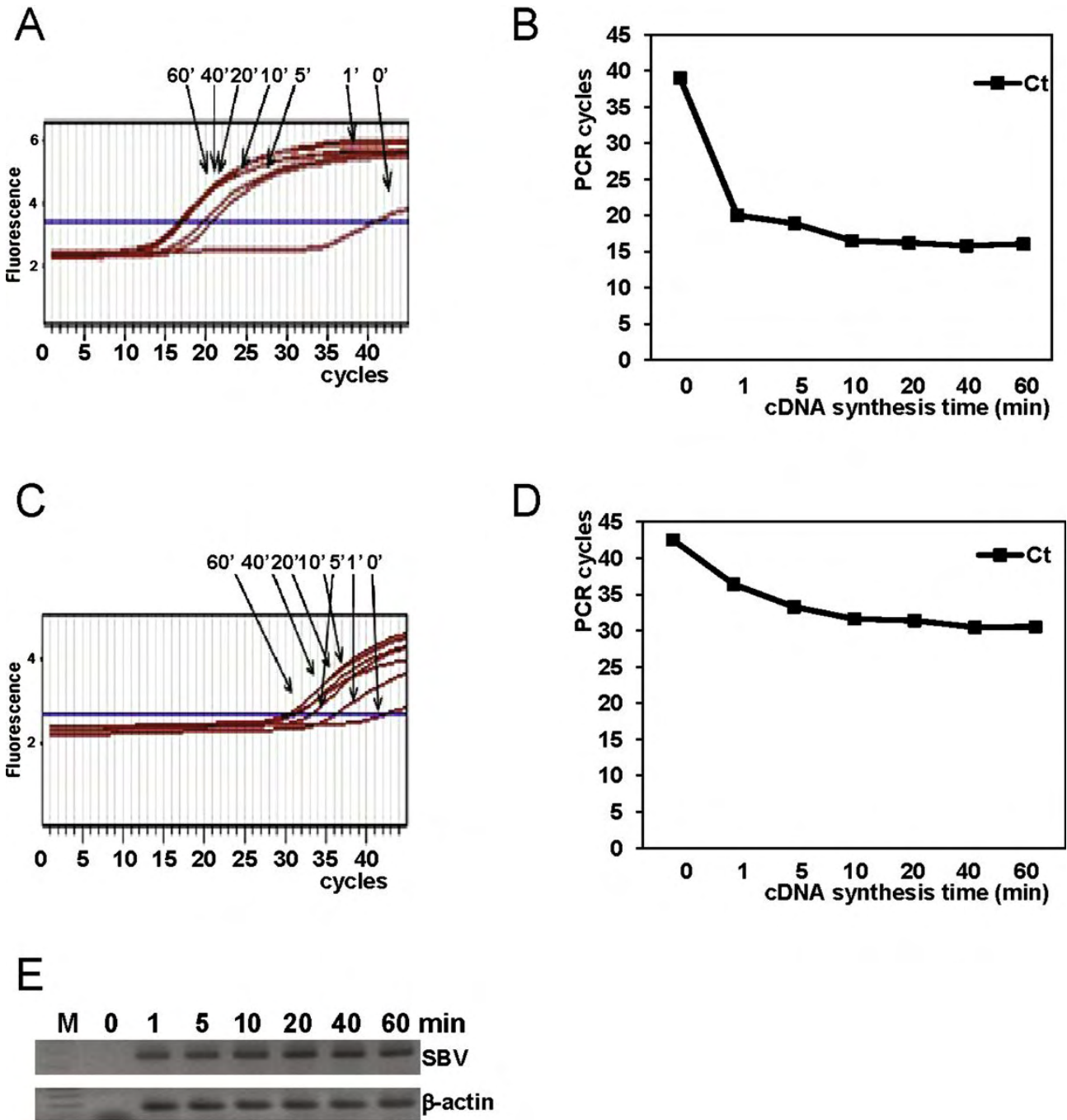


Fig 2. Real-time PCR detection of SBV in cDNA synthesized at different incubation time. Total RNA from two different samples of SBV-infected honeybees were used for cDNA synthesis for different time of retensions. Then, $1\mu\text{l}$ of each cDNA was subjected to Real-time PCR for comparison of the C_T value. The C_T value of sample 1 (A) and sample 2 (C). The relationship between the time to cDNA-synthesis and the C_T value of sample 1 (B) and sample 2 (D). E. Electrophoresis of the PCR product of β -actin and SBV gene from sample 1. (lane M. DNA marker, lane 0. No reverse transcription, Lane 1, 5, 10, 20,

40, 60: used cDNA as the template after 1; 5; 10; 20; 40; 60 min of incubation).

(4) 감염시료에 대한 DWV 특이 역전사 초고속 PCR의 적용

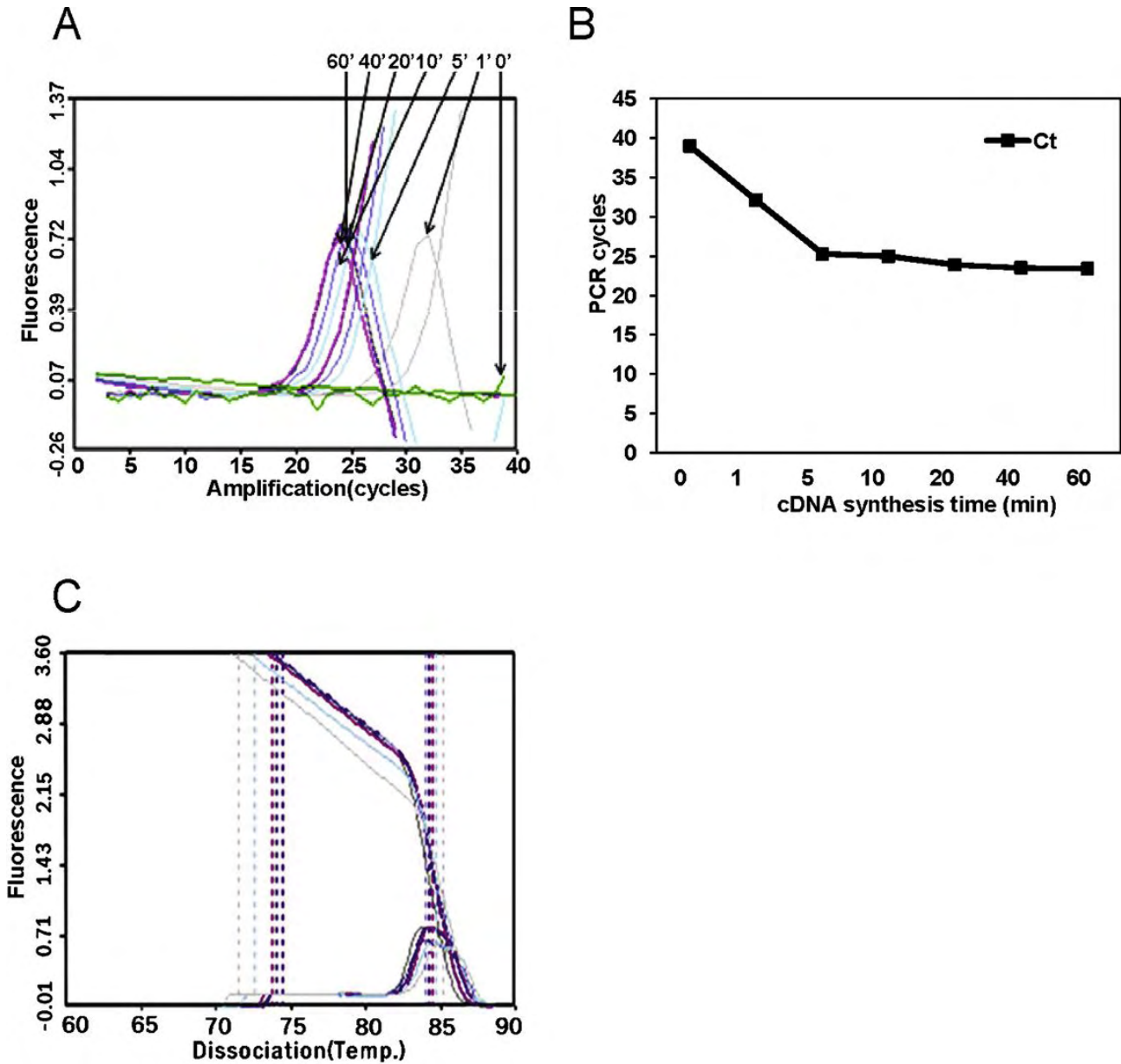


Fig 3. Application of Ultra-rapid Real-time PCR assay for detection of SBV.

Reverse transcription was performed for different time of retentions using a total RNA from two separate fecal samples of SBV-infected honeybees. Then these cDNAs were used as the template for Ultra-rapid Real-time PCR. A. Fluorescence intensity. B. Relationship

between the time of cDNA-synthesis and C_T value. C. The melting temperature analysis of cDNA synthesized from SBV-infected field samples.

2. LAMP법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발

가. 서론

꿀벌(*Apis mellifera* L.)은 화분매개 곤충으로 전 세계 주요 100대 농작물의 71%를 수정하여 농업생산에 큰 영향을 줄 뿐만 아니라 각종 유용 산물을 생산하여 그 경제적 가치는 매우 높다(이 등, 2011). 그러나 해충, 응애, 원생동물, 곰팡이, 박테리아, 바이러스 등에 의하여 유발된 질병으로 봉군 감소 및 폐사로 인하여 농업생산에 심각한 위기를 초래하고 있다(윤병수, 2001).

Sacbrood virus(SBV)는 꿀벌 유충에 심각한 질병을 야기하는 바이러스로, 1913년 처음 발견되어 1964년에 와서야 그 특징이 규명되었다(Bailey, 1964). Picornavirus로 직경 28nm의 원형의 capsid를 가지며 2858개의 아미노산이 polyprotein을 구성하고 있으며, 다른 꿀벌 바이러스와 다르게 하나의 큰 open reading frame으로 이루어져있다(Ghosh *et al.*, 1999). 이 바이러스에 감염된 유충은 점차 갈색으로 변하며 결국엔 번데기가 되지 못하고 죽는데(Bailey, 1975), 탈피액이 외피에 모이면서 주머니 모양을 형성하여 낭충봉아부패병이라고도 불린다(김 등, 2008)

최근 3년간 한국에서 SBV에 의한 피해 신고가 꾸준히 증가하여 왔으며, 2010년에는 토종벌(*Apis ceranae*) 전체의 75% 이상이 폐사하였다(이 등, 2011). 현재까지 과학적으로 증명된 SBV 치료법이 없기 때문에 감염을 예방하는 것이 가장 중요한데, 꿀벌은 집단생활을 하여 병의 전파가 급속도로 이루어져 빠른 진단을 통한 격리조치가 효과적인 예방법이라 할 수 있다.

현재까지 개발된 SBV 진단법으로 PCR (김 등, 2008; Nguyen Thi *et al.*, 2008;), Real-Time PCR (Nguyen Thi *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011)을 이용하는 방법이 있으나 이 방법들은 실험실적인 방법으로 시료 채취 후 실험실로 운반하여 검사하기까지 오랜 시간이 걸려 시료의 손상을 막기 어려울 뿐만 아니라 PCR 과정에서 요구되는 온도변화에 의해 시료가 변형될 가능성이 있고, 고가의 장비를 사용하기 때문에 현장에 적용하기에 어려움이 있다(이 등, 2011).

반면에 2000년도에 개발된 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법은 등온에

서 1시간 이내에 DNA 신장이 가능한 방법으로 고가의 장비인 thermocycler 없이 간단한 항온 기반으로 실험이 가능하고(Notomi *et al.*, 2000), 6개의 독립된 자리를 인식하기 때문에 보다 높은 특이성을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 LAMP법을 이용하여 SBV의 검출법을 개발하고 이를 양봉현장에 실제 적용 가능하도록 최적화를 도모하였으며, 현장적용 가능성을 높이기 위해 SybrGreen 및 phenol red를 사용하여 육안으로 확인할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 꿀벌 시료의 수집

본 연구에서 사용된 꿀벌시료는 질병의 진단을 위하여 2010년과 2011년에 국내 양봉가로부터 한국꿀벌질병연구소로 위탁되었다. 연구소에 성충시료가 도착한 즉시 외형 관찰과 해부검사를 수행하였고, 곧 바로 RNA의 순수분리에 사용하였다.

(2) RNA의 순수분리

SBV에 감염되었다고 의심되는 꿀벌시료를 LAMP법을 사용하여 진단하기 위하여 꿀벌시료로부터 total RNA를 추출하였다. RNA의 순수분리를 위하여 Total RNA Extraction Kit (Intron, Korea)를 사용하였으며, 실험은 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 추출된 total RNA는 OD 260nm에서 농도를 측정하고 바로 역전사효소반응(reverse transcriptase reaction)에 사용하였으며, 잔여 total RNA는 초저온 냉동고(-70℃이하)에 보관하였다.

(3) 역전사효소반응

추출된 total RNA 2µg와 100pmole oligo dT를 혼합하여 10분간 65℃도에서 정치한 뒤, 10×reaction buffer, 100mM DTT, 2.5mM dNTP, 200unit MMLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea), 10unit RNase inhibitor (Bioneer, Korea)를 첨가하여 90분간 40℃에서 반응시켜 cDNA를 제작하였다.

(4) Clone의 배양 및 plasmid DNA의 순수분리

Nguyen Thi (2008)등에 의하여 polyprotein gene의 일부(GenBank, AF092924; 6336-7159bp)가 cloning된 SBV3 plasmid를 소유하고 있는 균을 LB배지에서 37°C, 16시간동안 200rpm으로 배양하였다. 배양된 균으로부터 plasmid DNA 추출에는 DNA-spin™ Plasmid DNA purification Kit (Intron, Korea)를 사용하였으며, 실험은 제작자의 지시에 따라 진행하였다. 추출된 plasmid DNA는 spectrophotometer를 이용하여 농도를 측정한 뒤 LAMP법에 사용하였으며, 잔여 plasmid DNA는 초저온 냉동고(-70°C 이하)에 보관하였다.

(5) SBV-LAMP법의 primer 설계 및 제작

SBV-LAMP에 사용할 primer set는 Table 1에 나타내었다. Forward inner primer인 SBV-FIP는 SBV anti-sense sequence의 상보적인 염기서열(F2)과 TTTT linker 그리고 loop를 형성하는 염기서열(F1c) 부분을 결합한 것으로 49nt의 long-nucleotide로 제작하였다. Reverse inner primer인 SBV-BIP는 SBV sense sequence의 상보적인 염기서열(B2)과 TTTT linker, loop를 형성하는 염기서열(B1c) 부분을 결합한 것으로 각각 45nt의 long-nucleotide로 제작하였다. 또한 outer primer인 SBV-F3와 SBV-B3는 inner primer들의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각각 19, 18nt의 크기로 제작하였다. 이 primer set는 Bionics 사(Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 inner primer들의 경우에는 PAGE 정제 후 사용하였다(Fig. 1).

Table 1. Information of SBV-LAMP primer set.

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
SBV-F3	CGCGAATGATGTCATCTGT	19
SBV-B3	ATCTTCCAACCTGCACCAC	18
SBV-FIP ¹⁾	CAATAGGTCTTTGAGAACGGGATAATTTTCGATTATTCAC AACAGGGAG	49
SBV-BIP ²⁾	GCGAAGGATCTTGTGGAGAAGGTTTTGTTGGGACTTCAGT GCTAA	45

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

```
5'-CGGTATTTTACGCGAATGATGTCATCTGTTACGATTATTCACAACAGGGAGCTTG
      SBV-F3              SBV-F2(sense)
TGGATCCTTGTGCTTTTATCCCGTTCTCAAAGACCTATTGTGGGAATGCATTTTGC
      SBV-F1(loop)
TGGTCGGGGCGAAGGATCTTGTGGAGAAGGTTATGGAGTTATTTTGAATAAGAGGC
      SBV-B1(loop)
CATTGGGGATATTTTAGCACTGAAGTCCCAACCTGTGGTGCAGTTGGGAAGATTGG-3'
      SBV-B2(anti-sense)  SBV-B3
```

Fig. 1. Nucleotide sequences and location of primers for SBV-LAMP.

(6) SBV-LAMP 최적 반응 온도 및 반응액 조성

SBV 검출을 위한 primer set의 활성 최적 온도를 측정하였다. 반응액은 주형인 SBV3 (Kim Cuc *et al*, 2008) 1ng, SBV-FIP/BIP는 각각 40pmole, SBV-F3/B3는 각각 10pmole, 5mM dNTP, 10×Reaction buffer, 8U *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A), DMSO(최종농도 5%)를 첨가하여 총 20µl로 조성하였다. *Bst* DNA polymerase는 80°C 이상이 되면 불활성화 되는 특징을 가지고 있어, 94°C에서 5분간 DNA를 해리시킨 뒤 즉시 4°C로 온도를 낮추고 1분 정지 후에 첨가하였으며, 이 후 60분간 DNA 신장을 진행하고 80°C에서 10분간 정지해 *Bst* DNA polymerase를 불활성화 시킨 후 종료하였다. DNA 신장의 최적온도 측정은 52-61°C 구간에서 1시간 동안 등온조건하에서 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하여 SBV-LAMP에 대한 최적온도를 측정하였다.

또한 SBV-LAMP의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer set와 dNTP의 농도를 달리 하여 반응액 조성에 따른 최적 조건을 확인하였다. Primer의 농도는 Notomi 등 (2000)이 제시한 outer primer와 inner primer의 농도가 1:4 일 때 가장 높은 효율을 보였다는 결과를 바탕으로 이 비율을 유지하되 primer의 절대농도만을 변화시켜 그 결과를 측정하였다.

즉, inner primer의 각 농도가 5pmole, 10pmole, 15pmole, 20pmole, 25pmole일 때 outer primer의 각 농도는 1.25pmole, 2.5pmole, 3.75pmole, 5pmole, 6.25pmole로 하여 LAMP를 수행하였다. dNTP의 경우 각각 1.25mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM, 10.0mM이 되도록 조성하여 측정함으로써 최적 반응 조건을 확립하였다.

(7) Restriction을 통한 SBV-LAMP 생성물 확인

SBV-LAMP법을 통해 신장된 DNA가 SBV specific DNA가 맞는지 확인하기 위하여, 신장된 DNA에 존재하는 restriction site를 이용하였다. Restriction 반응액 총량은 20 μ l로 LAMP product 8 μ l, 20U의 *Bam*H I 를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 정치한 뒤 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

(8) SBV-LAMP에서 primer의 검출한계

SBV-LAMP의 검출한계를 측정하기 위하여 SBV3 plasmid의 copy수를 아래의 식에 따라 계산하여 1 \times 10⁸ copies부터 1/10씩 단계희석한 후, 이를 주형으로 하여 확립된 최적조건에서 LAMP를 수행하였다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration} (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g/mol})} = \text{amount} (\text{copies}/\mu\text{l})$$

(9) 꿀벌시료에서의 LAMP법과 PCR법에 의한 SBV 검출

본 연구를 통해 개발된 SBV-LAMP법이 양봉현장에서 적용될 수 있는지 확인하기 위하여 PCR법에 의하여 SBV 감염꿀벌로 확인된 시료의 cDNA를 주형으로 하여 LAMP법으로 감염을 재확인하였다.

(10) Fluorescent Dye test

SBV-LAMP 종료 후 전기영동의 수행없이 확인하기 위하여, DNA 이중 가닥에 삽입되어 녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I, Gene-FinderTM Nucleic acid fluorescent dye (Baygene Biotech Company Limited, China), pH에 따라 색상의 변화를 보이는 phenol red를 사용하였다. SYBR Green I 을 사용한 경우에는 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하였고 Gene-FinderTM Nucleic acid fluorescent dye와 phenol red를 사용한 반응액은 형광등을 광원으로 하여 관찰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) SBV-LAMP 최적 반응 온도 및 반응액 조성

LAMP 반응의 최적 반응 조건을 측정하기 위하여 SBV3 plasmid DNA를 주형 DNA로 사용하였다. 최적 등온 온도를 측정하기 위하여 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 61°C에서 1시간 동안 각기 등온조건하에서 SBV-LAMP를 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하였다. 52-58°C의 범위에서 SBV-specific DNA가 신장되는 것을 확인하였다(Fig. 2-A). SBV-LAMP의 최적 등온 온도는 반복실험을 통하여 57°C 로 측정되었으며, 이후의 실험은 측정된 온도인 57°C에서 수행하였다.

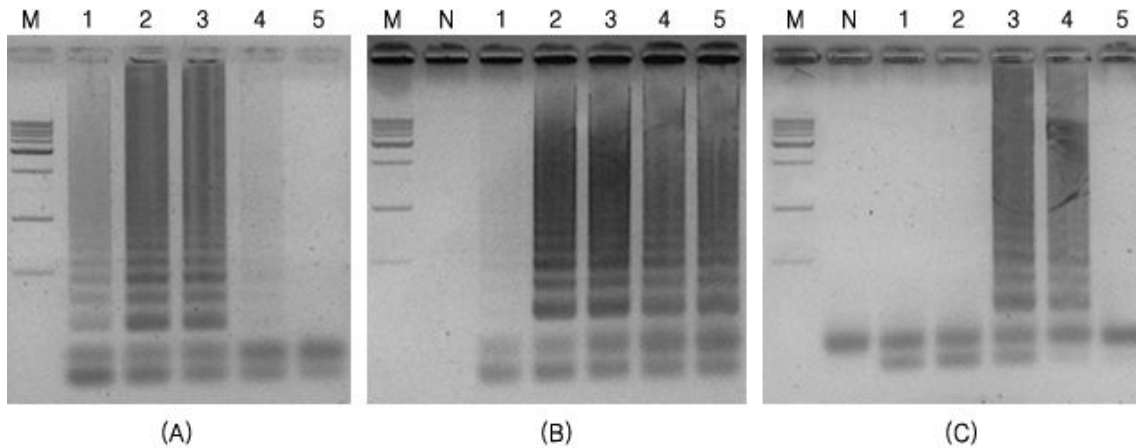


Fig. 2. Temperature gradient SBV-LAMP. And The optimal concentration of reaction solutions. **Panel A.** Temperature gradient SBV-LAMP. Lane M is 1KB ladder Marker (Basic Bio). Lane 1 to 5 were specific LAMP product from each LAMP under isothermal temperature at 52, 54, 56, 58, and 61°C, respectively. Lane N is without template. Optimal elongation temperature was determined at 54.0°C. **Panel B.** The optimal concentration of primers. Lane M is 1KB ladder Marker (Basic Bio). Lane N, 0pmole SBV-FIP/BIP and 0pmole SBV-F3/B3; Lane 1, SBV-LAMP using 20pmole SBV-FIP/BIP and 5pmole SBV-F3/B3; Lane 2, SBV-LAMP using 40pmole SBV-FIP/BIP and 10pmole SBV-F3/B3; Lane 3, SBV-LAMP using 60pmole SBV-FIP/BIP and 15pmole SBV-F3/B3; Lane 4, SBV-LAMP using 80pmole SBV-FIP/BIP and 20pmole SBV-F3/B3; Lane 5, SBV-LAMP using 100pmole SBV-FIP/BIP and 25pmole SBV-F3/B3. **Panel C.** The optimal concentrations of dNTP. Lane M is 1KB ladder Marker (Basic Bio). Lane N is negative control. Lane 1 to 5, LAMP products using 1.25mM: 2.5mM; 5mM; 7.5mM; 10mM dNTP. The optimal concentration of dNTP was determined at 5mM.

한편 SBV-LAMP의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP의 최적 농도를 구하였다. Primer 의 경우 inner primer가 각각 40pmole, outer primer가 각각 10pmole일 때 가장 많은 LAMP 생성물이 형성되었으며(Fig. 3-B), dNTP의 경우 5mM일 때, DNA의 신장이 가장 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 미량의 특이 DNA를 검출하고자 하는 본 연구에서 *Bst* DNA polymerase가 반응시간동안 긴 DNA까지 다양하게 합성해 낼 수 있는 점은 실험 결과의 판정에 매우 중요한 것이라 판단되며, 이를 통하여 과량의 dNTP는 LAMP의 반응을 저해한다는 사실을 알 수 있었다(이 등, 2011).

즉, SBV-LAMP를 위한 최적 반응액 조성은 총 20 μ l를 기준으로, 각각 40pmole의 inner primer, 각각 10pmole의 outer primer, 5mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 8U *Bst* DNA polymerase (NEB, U.S.A)로 확인되었으며, 57 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 60분간 수행하는 것을 SBV-LAMP의 표준조건으로 결정하였다.

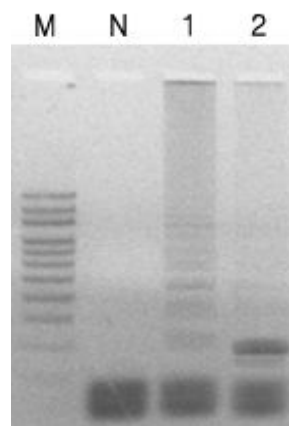


Fig. 3. Electrophoretic pattern of the LAMP and *Bam*HI digested product. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N is negative control. Lane 1 is LAMP product. Lane 2 is *Bam*HI digested product.

(2) Restriction을 통한 SBV-LAMP 생성물 확인

표준 SBV-LAMP법을 통해 신장된 DNA가 SBV specific DNA가 맞는지 확인하기 위하여, 반응이 종료된 LAMP 반응액에 *Bam*HI 제한효소를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 정치한 뒤 전기영동을 통해 확인하였다.

제한효소를 처리하지 않은 lane 1에서는 loading well까지 신장된 DNA를 관찰할 수 있었으며, lane 2에서는 제한효소에 의해 DNA가 절단되어 약 170bp의 DNA band를 확인할 수 있었다. 따라서 SBV-LAMP법에 의하여 신장된 DNA는 SBV specific DNA임이 확인되었다.

(3) SBV-LAMP의 민감도 확인

SBV-LAMP의 검출한계를 특정하기 위하여 SBV3 plasmid를 1×10^8 copies부터 1×10^2 copy까지 1/10씩 단계별로 희석한 후, 희석액 $1 \mu\text{l}$ 를 주형으로 사용하였다.

검출한계 측정 결과 1×10^3 copies까지 SBV-LAMP를 통해 검출할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4)

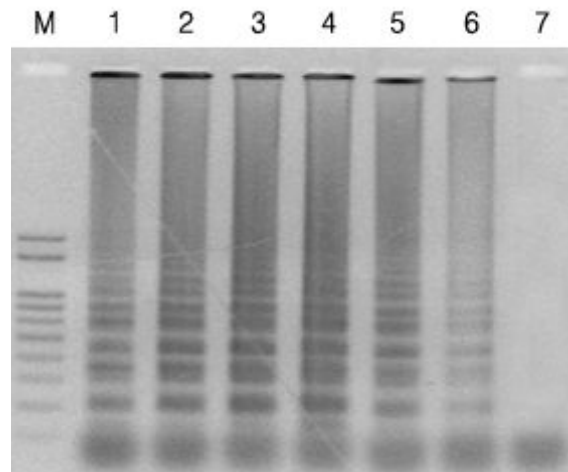


Fig. 4. Sensitivity test of primers in SBV-LAMP. Detection limit of SBV-LAMP. SBV3 plasmid solution containing 1×10^8 copies/ μl was serially 10-fold diluted. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1, SBV-LAMP with using 1×10^8 copies/ μl . Lane 2, SBV-LAMP with using 1×10^7 copies/ μl . Lane 3, SBV-LAMP with using 1×10^6 copies/ μl . Lane 4, SBV-LAMP with using 1×10^5 copies/ μl . Lane 5, ASBV-LAMP with using 1×10^4 copy/ μl . Lane 6, SBV-LAMP with using 1×10^3 copy/ μl . Lane 7, SBV-LAMP with using 1×10^2 copy/ μl .

(4) 꿀벌시료에서의 LAMP법과 PCR법에 의한 SBV 검출

한국꿀벌질병연구소를 통해 확인된 SBV에 감염된 꿀벌시료를 사용하여 SBV-LAMP를 수행하였다. LAMP법을 통한 확인은 본 연구에서 개발된 표준 SBV-LAMP법에 따라 수행하였으며, PCR법은 Nguyen Thi 등(2008)에 의해 개발된 방법을 사용하였다. 그 결과 두 방법 모두에서 DNA의 증폭이 성공적으로 이루어졌기에 LAMP법을 이용한 현장진단에는 큰 무리가 없을 것으로 사료된다.

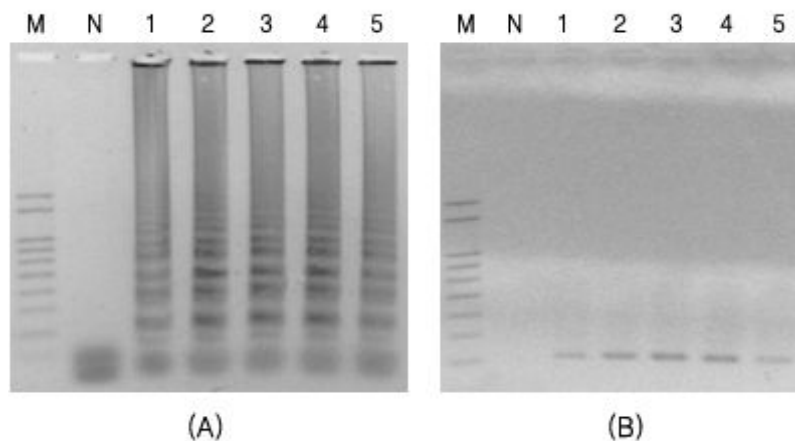


Fig. 5. Field test of primers in SBV LAMP. Panel A. Application of SBV-LAMP to infected honey bee samples. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N is negative control. Lane 1-5 are using honey bee sample by infected SBV and other diseases. This is reaction product by LAMP.**Panel B.** Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane N is negative control. Lane 1-5 are using honey bee sample by infected SBV and other diseases. This is reaction product by PCR.

(5) Fluorescent Dye test

SBV-LAMP 표준조건에 의해 증폭된 DNA를 전기영동을 하지않고 바로 관찰하기 위하여 SYBR Green I, Gene-FinderTM Nucleic acid fluorescent dye, phenol red 시약을 이용한 증폭여부 확인법을 개발하였다. DNA 이중가닥에 삽입되어 녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I의 경우에는 ultraviolet trans illuminator 상에서 관찰하였으며, Gene-FinderTM Nucleic acid fluorescent dye와 pH에 따라 색의 변화를 보이는 phenol red는 형광등 아래에서 관찰하였다.

SYBR Green I을 사용한 경우(Fig. 6-A) positive control이 좀 더 밝은 형광을 나타내었고, Gene-FinderTM Nucleic acid fluorescent dye(Fig. 6-B)를 사용한 경우 positive control에서는

노란색, negative control에서는 주황색으로 발현되었으며, phenol red를 사용한 경우(Fig. 6-C) positive control에서는 주황색, negative control에서는 적색으로 변화하는 것이 확인되었기에 현장진단에 매우 유용할 것으로 사료된다.

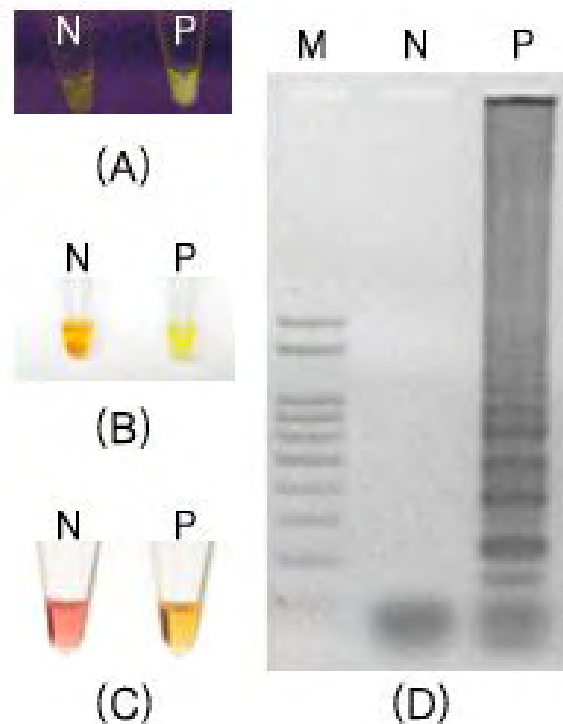


Fig. 6. SYBR Green I test of SBV-LAMP. **Panel A.** LAMP product (P) and negative control (N) and were stained by SybrGreen I. Each products were observed by ultraviolet transilluminator. **Panel B.** LAMP product (P) and negative control (N) and were stained by Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye. **Panel C.** LAMP product (P) and negative control (N) and were stained by phenol red. **Panel D.** Each products observed by ultraviolet transilluminator were analyzed by gel electrophoresis. Lane M is 100bp ladder marker (Forever). Lane P is LAMP product on pBX-*A. apis* plasmid. Lane N is negative control.

본 연구는 LAMP법을 기반으로 SBV를 현장에서 신속하고 정확하게 검출하는 방법 확립을 목적으로 수행되었다. 본 연구에서 개발된 SBV-LAMP는 SBV의 polyprotein gene을 target으로 4개의 primer (SBV-F3/B3/FIP/BIP)를 사용하며, 최적 반응액 조성은 총 20 μ l를 기준으로, 각각 40pmole의 inner primer, 각각 10pmole의 outer primer, 5mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 8U의 *Bst* DNA polymerase를 사용하며, 57 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 60분간 진행한다. SBV-LAMP

는 1×10^3 copies까지 검출이 가능하며, 실제 꿀벌시료에서도 검출이 가능하였다. 또한 SYBR Green I, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye, phenol red 시약을 이용하면 전기영동 없이 맨눈으로 DNA 신장 여부를 확인할 수 있기에 현장에서 바로 적용하기에 무리가 없을 것으로 사료된다.

라. 적요

Sacbrood virus (SBV)는 꿀벌의 전염성 질병으로 감염되면 번데기가 되지 못하고 죽게 된다. LAMP는 thermocycler 같은 고가의 장비없이도 유전자를 증폭할 수 등온증폭방법으로, 본 연구에서는 쉽고 빠르게 SBV를 진단할 수 있는 SBV-LAMP법을 개발하였다. SBV 특이 염기서열을 인식하는 SBV-F3/B3/FIP/BIP, 4개의 primer를 사용하여 57°C의 등온조건 하에서 60분간 정치하여 DNA가 성공적으로 증폭됨을 확인하였다. 1×10^3 copies/ μ l까지 증폭이 가능하며 실제 꿀벌에서도 검출가능함이 확인되었고 SYBR Green I, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye와 phenol red를 사용하여 전기영동 없이 육안으로 관찰할 수 있다. 따라서 SBV-LAMP는 현장에서 적용가능할 뿐만 아니라 감염여부도 쉽게 모니터링 할 수 있을 것으로 사료된다.

3. Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 PCR법 개발

가. 서론

1913년에 처음 발견된 Sacbrood virus (SBV)는 꿀벌 유충에 심각한 질병을 야기하는 바이러스로, 1964년에 와서야 그 특징이 규명되었다(Bailey, 1964). 유충이 이 바이러스에 감염되면 점차 갈색으로 변하며, 결국엔 번데기가 되지 못하고 죽는다(Bailey, 1975). 탈피액이 외피에 모여 주머니 모양을 형성한다고 하여, 한국에서는 낭충봉아부패병이라고 불린다(김 등, 2008).

일반적으로 서양종 꿀벌인 *Apis mellifera* (*A. mellifera*)에서 검출되면 발견 지역에 상관없이 SBV라 통칭하고, 동양종 꿀벌인 *Apis cerana* (*A. cerana*)에서 검출되는 SBV는 지역에 따라 뚜렷한 염기서열의 차이를 보이기 때문에 서로 다르게 명명되고 있다. 현재 태국에서 검출된 것은 Thai Sacbrood virus (TSBV), 중국에서 보고된 것은 Chinese Sacbrood virus (CSBV)라 불린다(Rana *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 2011). 최 등(2010)에 의하여 한국산 *A. cerana*

에서 발견된 SBV는 2011년에 한국양봉학회지에 Korean Sacbrood virus로 명명되었다(Han *et al.*, 2011).

한편 최근 4년간 한국에서는 KSBV에 의한 피해가 급증하여 토종벌(*A. cerana*) 전체의 75% 이상이 폐사하였다(이 등, 2011a). 현재까지 과학적으로 증명된 치료법이 전무하기 때문에 치료보다는 사전에 감염을 예방하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 하지만 꿀벌은 집단생활을 하기 때문에 병의 전파가 급속도로 이루어지는 바, 빠른 진단을 통한 격리조치가 효과적인 예방법이라 할 수 있겠다(이 등, 2011a).

현재까지 국내에 개발된 SBV 진단법으로 PCR (김 등, 2008; Nguyen Thi *et al.*, 2008), Real-Time PCR (Nguyen Thi *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2011) 및 Ultra-rapid Real-time PCR (Yoo *et al.*, 2012)을 이용하는 실험실적인 방법과 현장적용이 가능한 SBV-LAMP (이 등, 2011b)이 존재한다. 그러나 이 검출법은 SBV 또는 KSBV를 단일 검출하는 방법으로 진단시 선택한 검출법에 따라 결과가 상이하게 다를 수 있으며, 확진을 위해서는 추가실험이 필수적이다.

따라서 본 연구에서는 *A. mellifera*와 *A. cerana*에서 각각 검색된 SBV의 염기서열 차이를 바탕으로 한 쌍의 forward/reverse primer를 이용하여 SBV와 KSBV를 구별 검출할 수 있는 진단법을 개발하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 꿀벌 시료의 수집

본 연구에서 사용된 꿀벌시료는 질병의 진단을 위하여 2011년에 국내 양봉가 및 토봉가로부터 한국꿀벌질병연구소로 위탁되었다. 연구소에 유충 및 성충시료가 도착한 즉시 외형 관찰과 해부검사를 수행하였고, 곧 바로 RNA의 순수분리에 사용하였다.

(2) RNA의 순수분리

SBV에 감염되었다고 의심되는 꿀벌시료로부터 total RNA를 추출하였다. RNA의 순수분리를 위하여 Total RNA Extraction Kit (Intron, Korea)를 사용하였으며, 실험은 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 추출된 total RNA는 OD 260nm에서 농도를 측정 후 바로 역전사효소반응(reverse transcriptase reaction)에 사용하였으며, 잔여 total RNA는 초저온 냉동고(-70°C 이하)에 보관하였다.

(3) 역전사효소반응

추출된 total RNA 3µg와 100pmole oligo dT를 혼합하여 10분간 65°C에서 정치한 뒤, 10×reaction buffer, 100mM DTT, 10mM dNTP, 200unit M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea), 10unit RNase inhibitor (invitrogen, U.S.A.)를 첨가하여 60분간 40°C에서 반응시켜 cDNA를 제작하였으며, 제작된 cDNA는 곧 바로 PCR 반응에 사용하였다.

(4) Primer의 설계 및 제작

GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 SBV (Genbank No. AF469603), KSBV (Genbank No. HQ322114), CSBV (Genbank No. HM237361)의 염기서열을 Clustal X 프로그램을 통해 정렬 및 비교하여, 상동성뿐만 아니라 일부 결손된 부위도 확인하였다(Fig. 1). 이 결손된 부분을 포함하도록 primer를 설계하여 증폭된 PCR 산물의 크기에 따라 세 종류의 SBV가 구별될 수 있도록 하였다(Table 1).

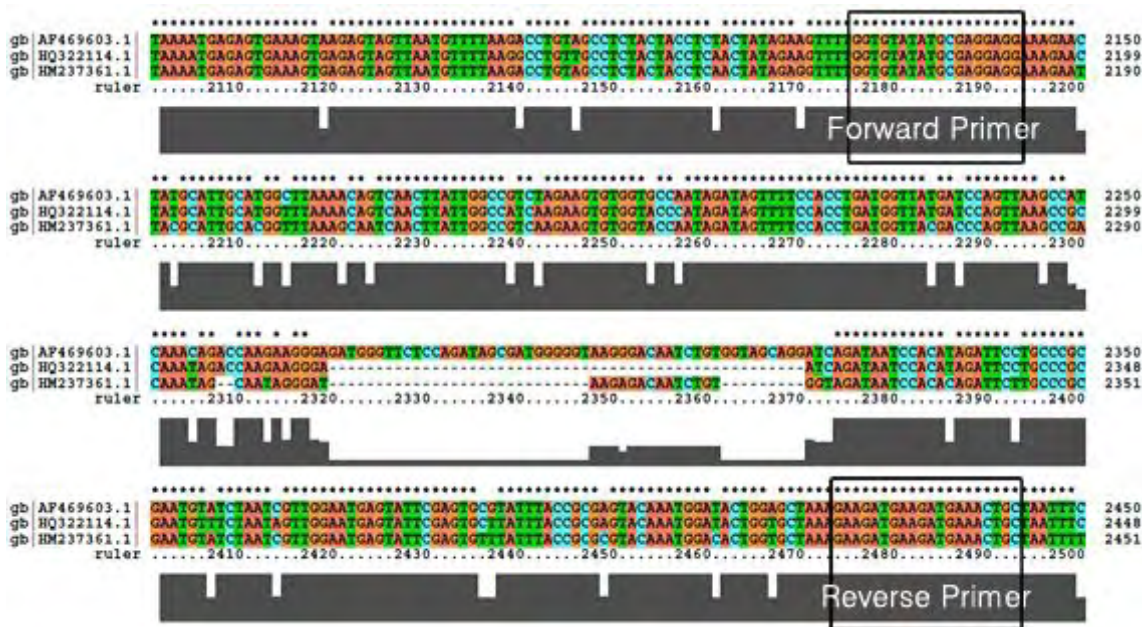


Fig. 1. Nucleotide sequences and location of primers for SBVs.

Table 1. primers of sacbrood virus for cloning and detection.

Oligo name	Sequence (5' → 3')	mer	target	product size	Reference
SBV-F	GGT GTA TAT GCG AGG AGG	18	SBV	318 bp	this study
			CSBV	279 bp	
SBV-R	GCA GTT TCA TCT TCA TCT TC	20	KSBV	267 bp	

(5) Molecular cloning

제작된 cDNA를 SBV-F/R primer를 이용하여 PCR로 증폭시킨 뒤, molecular cloning을 수

행하였다. PCR 조성으로는 TOPsimple™ DryMIX-HOT (Enzynomics™, Korea)을 이용하였으며, 94℃에서 5분간 pre-denaturation 후, 94℃에서 20초, 50℃에서 20초, 72℃에서 20초를 1cycle로 하여 40cycle 반복 수행하고 72℃에서 7분간 post-extension을 수행하였다. 증폭된 유전자는 *Xcm I*에 의하여 절단된 pBX vector에 삽입시켜 recombinant DNA를 제작하였으며, 이를 DH5a F'에 transformation 하였다. 제한효소 절단과 DNA 염기서열 분석을 통해 clone을 선별하였으며, pBX-SBV와 pBX-KSBV로 각각 명명하였다.

(6) 최적조건의 검색

SBV와 KSBV 구별 검출을 위한 primer의 최적 annealing 온도를 측정하기 위하여, 반응액은 pBX-SBV와 pBX-KSBV plasmid를 각각 주형으로 하여 1ng, SBV-F/R primer는 각각 10pmole, 2.5mM의 dNTP, 2.5U의 *Taq* polymerase, 10×Reaction buffer (with 25mM MgCl₂)를 첨가하여 총 20μl로 조성하였다. DNA 증폭의 최적 annealing 온도 측정은 45-65℃ 구간에서 진행하였으며, 각 반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하여 pBX-SBV, pBX-KSBV 각각에 대한 최적 annealing 온도를 측정하였다.

또한 SBV와 KSBV 구별 검출법의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP, *Taq* polymerase, MgCl₂의 농도를 달리하여 반응액 조성에 따른 최적 조건을 확인하였다. Primer의 경우 각각 0, 10, 20, 30, 40 pmole이 되도록 조성하였으며, dNTP의 경우에는 각각 0, 2.5, 5, 7.5, 10 mM, *Taq* polymerase의 경우에는 각각 0, 2.5, 5, 7.5, 10U, MgCl₂의 경우에는 0, 10, 20, 40, 80 mM로 조성하여 측정함으로써 최적 반응 조건을 확인하고 이를 표준 검출법으로 확립하였다.

(7) 검출한계 측정

SBV와 KSBV 구별 검출법의 검출한계를 측정하기 위하여 pBX-SBV와 pBX-KSBV plasmid의 copy 수를 아래의 식에 따라 계산하여 1×10⁷ copies부터 1/10씩 단계희석한 후, 이를 주형으로 하여 확립된 표준 검출법으로 PCR을 수행하였다.

$$\frac{6 \times 10^{23} (\text{copies/mol}) \times \text{concentration} (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MW} (\text{g/mol})} = \text{amount} (\text{copies}/\mu\text{l})$$

(8) 꿀벌시료에서 SBV와 KSBV 진단

본 연구를 통해 개발된 SBV와 KSBV 구별 검출법이 실제 꿀벌에 적용될 수 있는지 확인하기 위하여, 한국꿀벌질병연구소에서 SBV 감염꿀벌로 확인된 시료의 RNA를 제공받아 cDNA

제작 후, 이를 주형으로 하여 개발된 검출법으로 감염을 재확인하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) Molecular cloning

증폭된 SBV 및 KSBV의 PCR product는 TA-cloning을 이용하여 확보하였으며, 염기서열 분석을 통해 pBX-SBV와 pBX-KSBV로 각각 명명하였다. 또한 BLAST하여 기존에 등록된 염기서열과 상동성을 확인하였다. 그 결과 pBX-SBV의 염기서열은 GenBank No. JQ390591.1와 98%, pBX-KSBV의 염기서열은 HQ322114.1와 100% 일치함을 보여주었다.



Fig. 2. Nucleotide sequences of recombinant plasmid which are pBX-SBV and pBX-KSBV.

(2) 최적조건의 검색

SBV와 KSBV 구별 검출법의 최적 반응 조건을 측정하기 위하여 pBX-SBV와 pBX-KSBV plasmid DNA를 template로 사용하였다. Annealing 온도는 45-65(45.0, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, 65.0)℃ 구간에서 검색하였으며, 각 PCR 반응이 종료된 후 전기영동으로 확인하였다. pBX-SBV와 pBX-KSBV 모두 45-65℃ 범위에서 특히 유전자가 증폭되는 것을 확인할 수 있었으나 62℃ 이상의 온도에서는 증폭량이 62℃ 미만보다 감소하는 것으로 판단되어 최적 annealing 온도는 60℃로 결정하였고, 이후의 실험은 측정된 온도인 60℃에서 수행하였다.

한편 SBV와 KSBV 구별 검출법의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP, *Taq* polymerase, MgCl₂의 최적 농도를 구하였다. SBV-F/R primer를 각각 10pmole를 첨가한 경우,

40pmole의 primer를 사용한 경우와 증폭량의 차이가 없었으며(Fig. 3-C), dNTP의 경우 2.5mM만을 사용해도 충분히 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3-D). 뿐만 아니라 *Taq* polymerase의 경우에도 2.5U만으로도 충분히 증폭되었다(Fig. 3-E). 그러나 $MgCl_2$ 의 농도에 따라서는 증폭량의 변화를 보였는데, pBX-KSBV의 경우 10mM이하(Fig. 3-E의 lane 2)에서는 증폭량이 감소하였고, pBX-SBV 20mM이하(Fig. 3-E의 lane 3')의 농도와 40mM 초과(Fig. 3-E의 lane 5')의 경우 증폭량이 현저히 감소하였다.

즉, SBV와 KSBV 구별 검출을 위한 최적 반응액 조성은 총 $20\mu l$ 를 기준으로 각각 10pmole의 SBV-F/R primer, 2.5mM dNTP, 2.5U *Taq* polymerase, 10×Reaction buffer (with 30mM $MgCl_2$)로 확인되었으며, 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초를 1cycle로 하여 40cycle 반복 수행하고 72°C에서 7분간 post-extension을 수행하는 것을 표준 검출법으로 확립하였다.

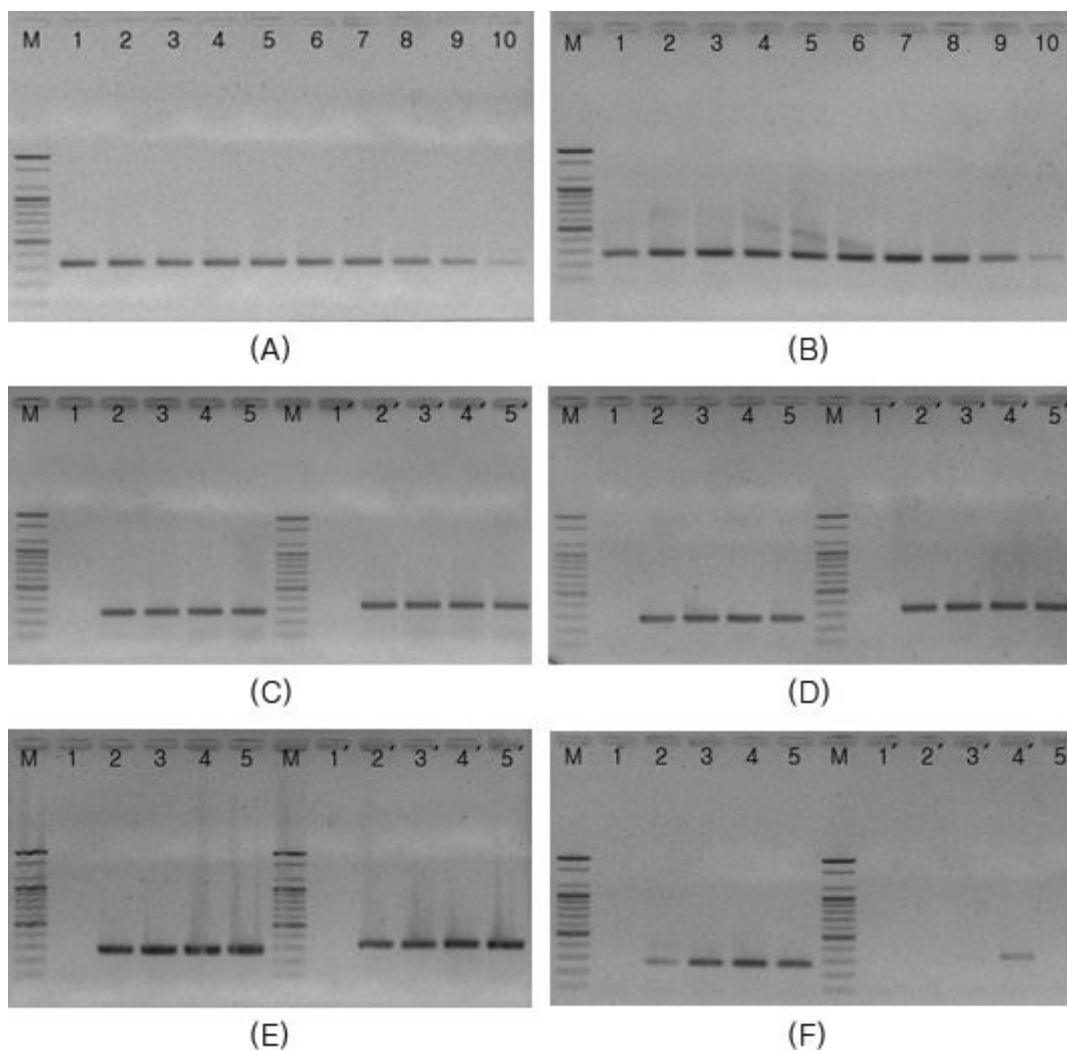


Fig. 3. Temperature gradient SBV and KSBV detection PCR. And The optimal concentration of reaction solutions. Panel A. Temperature gradient pBX-SBV detection PCR. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 to 10 were specific PCR product

from pBX-SBV under temperature at 45.0, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, and 65.0°C, respectively. Optimal annealing temperature was determined at 60.0°C. **Panel B.** Temperature gradient pBX-KSBV detection PCR. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 to 10 were specific PCR product from pBX-KSBV under temperature at 45.0, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, and 65.0°C, respectively. Optimal annealing temperature was determined at 60.0°C. **Panel C.** The optimal concentration of primers. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 and 1' are negative control. Lane 2-5 using 10, 20, 30, and 40mM primer for detection of pBX-KSBV. Lane 2'-5' using 10, 20, 30, and 40mM primer for detection of pBX-KSBV. The optimal concentration of primer was determined at 10pmole. **Panel D.** The optimal concentrations of dNTP. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 and 1' are negative control. Lane 2-5 using 2.5, 5, 7.5, and 10mM dNTP for detection of pBX-KSBV. Lane 2'-5' using 2.5, 5, 7.5, and 10mM dNTP for detection of pBX-KSBV. The optimal concentration of dNTP was determined at 2.5mM. **Panel E.** The optimal concentrations of *Taq* polymerase. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 and 1' are negative control. Lane 2-5 using 2.5, 5, 7.5, and 10U *Taq* polymerase for detection of pBX-KSBV. Lane 2'-5' using 2.5, 5, 7.5, and 10U *Taq* polymerase for detection of pBX-KSBV. The optimal concentration of *Taq* polymerase was determined at 2.5U. **Panel F.** The optimal concentrations of MgCl₂. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 and 1' are negative control. Lane 2-5 using 10, 20, 40, and 80mM MgCl₂ for detection of pBX-KSBV. Lane 2'-5' using 10, 20, 40, and 80mM MgCl₂ for detection of pBX-KSBV. The optimal concentration of MgCl₂ was determined at 30mM.

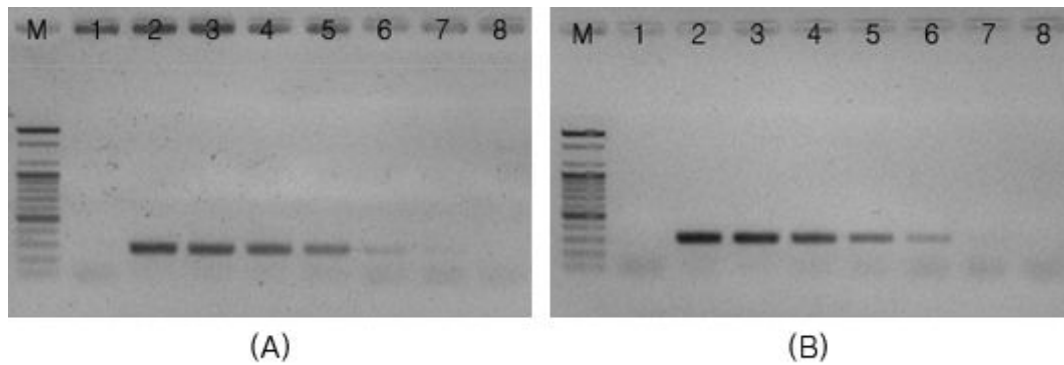


Fig. 4. Sensitivity test of primers in SBV and KSBV detection PCR. Detection limit of SBV and KSBV detection PCR. pBX-SBV and pBX-KSBV plasmid solution containing 1×10^7 copies/ μl was serially 10-fold diluted. Lane M is 100bp ladder Marker (Forever). Lane 1 is negative control. **Panel A.** Lane 2, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^7 copies/ μl . Lane 3, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^6 copies/ μl . Lane 4, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^5 copies/ μl . Lane 5, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^4 copies/ μl . Lane 6, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^3 copies/ μl . Lane 7, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^2 copies/ μl . Lane 8, pBX-KSBV detection PCR with using 1×10^1 copies/ μl . **Panel B.** Lane 2-8, pBX-SBV detection PCR with using 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 copies/ μl , respectively.

(3) 검출한계 측정

SBV와 KSBV 구별 검출법의 검출한계를 특정하기 위하여 pBX-SBV와 pBX-KSBV plasmid를 1×10^7 copies/ μl 부터 1×10^1 copies/ μl 까지 1/10씩 단계별로 희석한 후, 희석액 $1 \mu\text{l}$ 를 각각 주형으로 사용하였다.

검출한계 측정 결과 SBV와 KSBV 모두 1×10^3 copies까지 SBV와 KSBV 구별 검출법을 통해 검출할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

(4) 꿀벌시료에서 SBV와 KSBV 진단

한국꿀벌질병연구소에서 SBV 감염꿀벌로 확인된 시료의 RNA를 제공받아 cDNA 제작 후,

이를 주형으로 하여 확립된 SBV와 KSBV 구별 검출법으로 감염을 재확인하였다. 그 결과 모든 시료에서 SBV 또는 KSB가 검출되었다(Fig. 5). 한가지 특이사항은 *A. mellifera*에서 *A. cerana*에서 발견되는 KSBV가 발견되었다는 점이다(Fig. 5-lane 5 and 6).

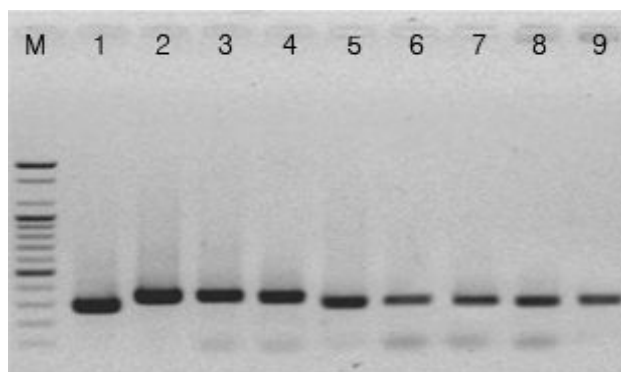


Fig. 5. Field test of primers in SBV and KSBV detection PCR. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer). Lane 1 and 2 are positive control which are pBX-KSBV and pBX-SBV. Lane 3-6 are using *A. mellifera* by infected SBV and other diseases. Lane 7-9 are using *A. cerana* by infected SBV and other diseases.

본 연구에서는 *A. mellifera*와 *A. cerana*에서 각각 검색된 SBV의 염기서열 차이를 바탕으로 한 쌍의 forward/reverse primer를 이용하여 SBV와 KSBV를 구별 검출할 수 있는 진단법을 개발하였다. 염기서열 분석을 통하여 KSBV에서 염기서열 결손을 확인하였으며, 이를 바탕으로 SBV의 경우 318 bp, KSBV의 경우에는 267 bp로 증폭되도록 primer를 설계 및 제작하였다.

한국꿀벌질병연구소로부터 SBV 및 KSBV에 감염된 꿀벌시료를 제공받아 RNA 추출, cDNA 제작, PCR, TA-cloning을 통하여 바이러스의 일부 염기서열을 확보하였으며, 각각 pBX-SBV, pBX-KSBV로 명명하여 이후 실험에 template로 사용하였다.

또한 제작한 SBV-F/R primer의 최적 annealing 온도, 최적 반응액 조성을 검색하였다. SBV와 KSBV 구별 검출을 위한 최적 반응액 조성은 총 20 μ l를 기준으로 각각 10pmole의 SBV-F/R primer, 2.5mM dNTP, 2.5U *Taq* polymerase, 10 \times Reaction buffer (with 30mM MgCl₂)이며, 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94 $^{\circ}$ C에서 20초, 60 $^{\circ}$ C에서 20초, 72 $^{\circ}$ C에서 20초를 1cycle로 하여 40cycle 반복 수행하고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extension을 수행하는 것을

표준 검출법으로 확립하였다.

확립된 표준 검출법을 바탕으로 primer의 검출한계 및 실제 꿀벌시료에 적용한 결과, primer의 검출한계는 pBX-SBV와 pBX-KSBV 모두에서 1×10^3 copies/ μ l로 확인되었으며, 꿀벌시료에서는 SBV 또는 KSBV가 검출되었다. 흥미로운 사실은 *A. mellifera*에서도 KSBV가 발견되었다는 것이다. 이는 국내에서 큰 피해를 입은 *Apis cerana*처럼 *Apis mellifera*도 막대한 피해를 입을 수 있다는 것을 암시하며, 지속적인 모니터링을 통해 관리가 필요할 것으로 사료된다.

라. 적요

Sacbrood virus (SBV)는 꿀벌의 전염성 질병으로 국내에서는 SBV와 Korean SBV (KSBV)가 검출된 바 있다. 본 연구에서는 SBV와 KSBV를 구별하기 위하여 두 virus의 염기서열을 비교하여, SBV의 경우에는 318 bp, KSBV의 경우에는 267 bp가 증폭될 수 있도록 primer를 설계하여 구별 검출법을 개발하였다.

최적 annealing 온도는 60°C로 측정되었으며, 검출한계는 1×10^3 copies/ μ l로 확인되었으며, 실제 꿀벌시료를 이용하여 구별 검출법을 적용한 결과 *Apis cerana*에 감수성이 높은 KSBV가 *Apis mellifera*에서도 검출되었다. 이는 국내에서 큰 피해를 입은 *Apis cerana*처럼 *Apis mellifera*도 막대한 피해를 입을 수 있다는 것을 암시하며, 지속적인 모니터링을 통해 관리가 필요할 것으로 사료된다.

4. Sacbrood Virus의 특이 항원 생산을 재조합 SBV Capsid protein의 발현 및 정제

가. 서론.

본 연구는 SBV (Sacbrood Virus) 특이 단백질 항원의 대량 생산을 목적으로, SBV의 Capsid protein 유전자를 대장균에서 재조합 발현시키고, 정제한 것이다. 본 연구는 Journal of Apiculture 27(3)에 “Over-expression and Purification of Capsid Protein of Sacbrood virus in *E.coli*”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 결과 및 고찰

(1) SBV capsid 항원 생산을 위한 재조합 플라스미드의 구축

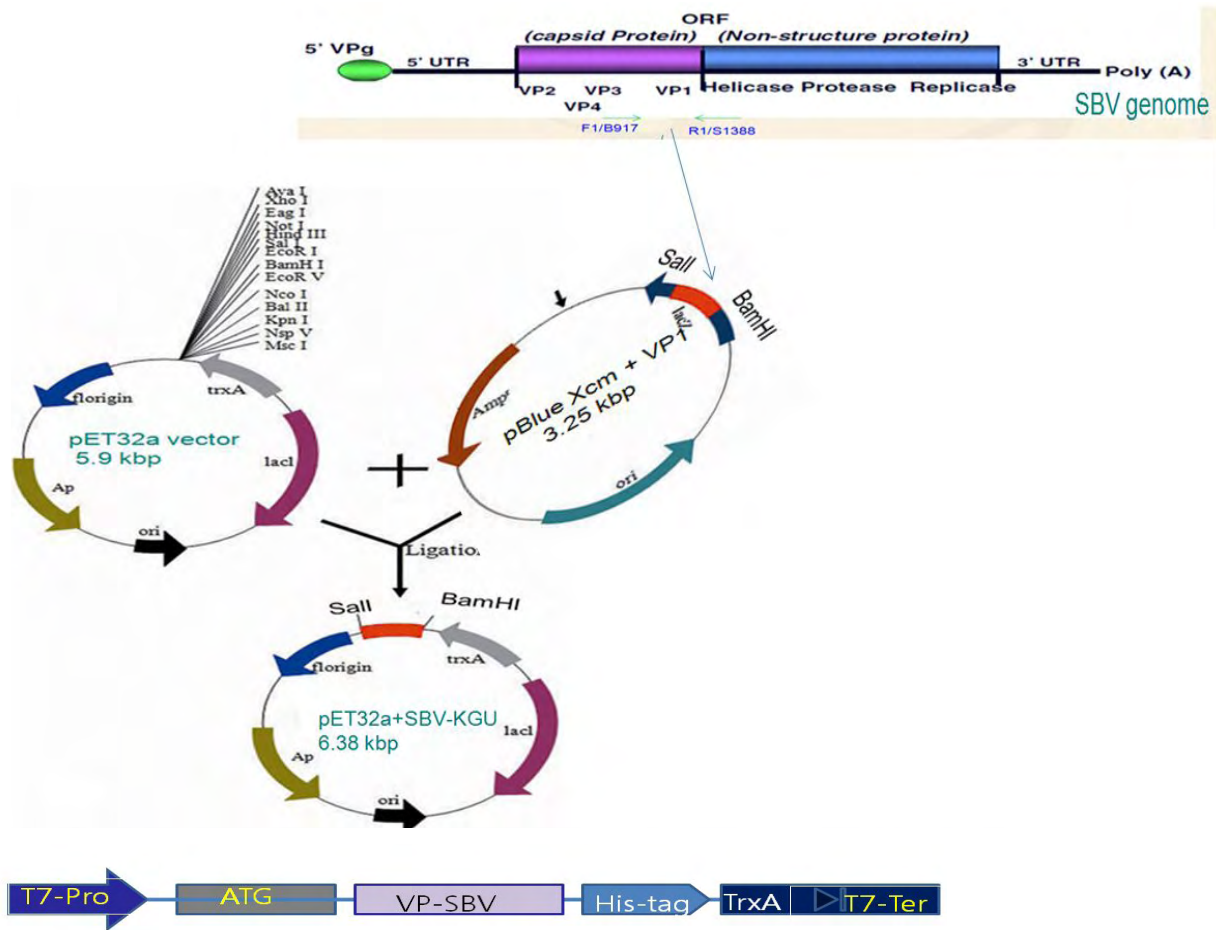


Fig.1. Construction of clones expressing the fused pET32a(+)-SBV492 expression vector

(2) 재조합 DNA법에 의한 SBV capsid 항원의 대량 생산

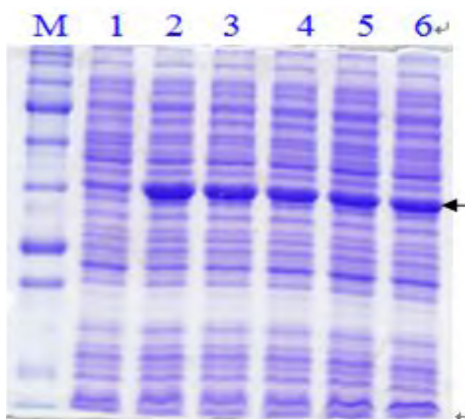


Fig.2 Examination of the expressions of the pET32a(+)-SBV492 fusion protein. After transformation and grown on the Amp/Cp plate, each colony was picked and grown overnight at 37°C/200 rpm, individually. Then, it was sub-cultured until reaching an OD of approximately 0.7, and then added 0.5mM IPTG (final concentration) for the expression of target recombinant protein. Lane M, protein size marker; Lane 1, pET32a+SBV non-induced; Lane 2-6, the pET32a+SBV clones were induced by 0.5mM IPTG. The black

arrow indicates expected band of molecular weight (37 kDa).

(3) SBV capsid 항원의 대량 생산을 위한 최적 유도체 농도

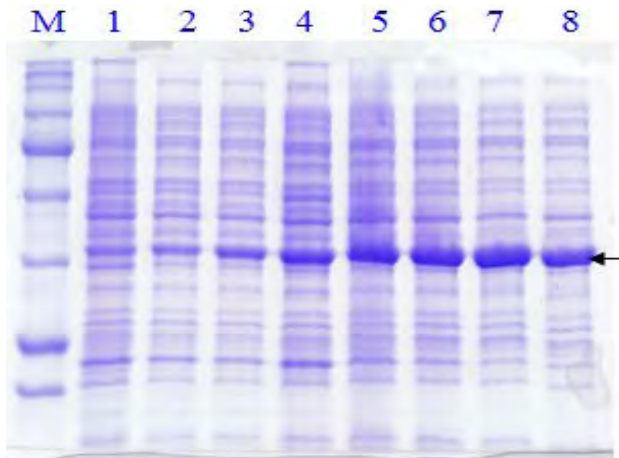


Fig.3. Optimization of IPTG concentration for expressing recombinant VP-SBV fusion protein Lane M, protein size marker; Lane 1, cultures non-induced; Lane 2-8, induced under different IPTG concentration of 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1 mM, respectively. The black arrow indicates the induced 37 kDa rVP-SBV protein.

(4) SBV capsid 항원의 대량 생산을 위한 최적 배양 시간

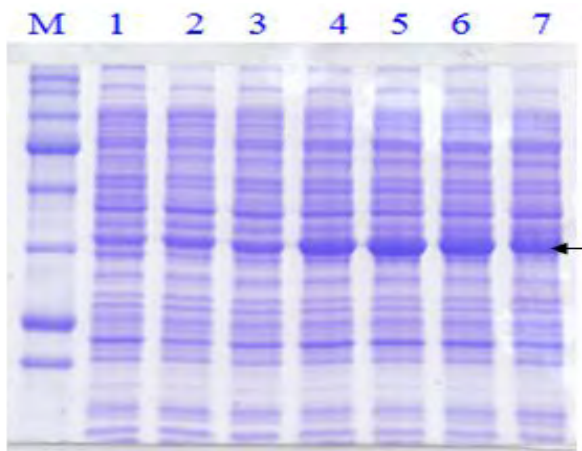


Fig.4. Optimum incubation time for the expression of SBV- recombinant protein. Lane M, protein size marker; Lane 1, pET32a+SBV non-induced; Lane 2-7, induced by 0.5 mM IPTG and collected cells on the time of 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours, individually. The black arrow indicated the desired protein band.

(5) His-tag법에 의한 재조합 SBV capsid 항원의 대량 정제

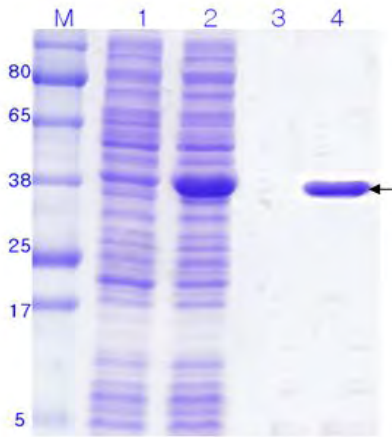


Fig.5. Purification of recombinant VP-SBV protein by His-tag column

His-tag purification of the recombinant VP-SBV was performed after suspension and dissolution of the inclusion bodies. Lane M, protein molecular weight marker; lane 1, crude supernatant from non-induced culture; lane 2, crude supernatant from induced culture; lanes 3 and 4, elutions of His-tag column from the non-induced or induced culture, respectively. The purified, recombinant VP-SBV protein was shown only in lane 4 (black arrow).

5. 특이 단일클론항체를 이용한 Sacbrood Virus의 검출

가. 서론.

본 연구는 SBV (Sacbrood Virus) 특이 단백질 항원인 재조합 Capsid protein을 항원으로 단일 클론항체를 선별하고, 이를 이용한 새로운 SBV의 면역학적 검출법을 개발한 것이다. 본 연구는 Journal of Apiculture (2013), 28(2)에 “Detection of Capsid Protein of Sacbrood Virus in Honeybee using Monoclonal Antibodies”의 제목으로 발표되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 결과

(1) 재조합 SBV-Capsid protein의 발현 및 정제

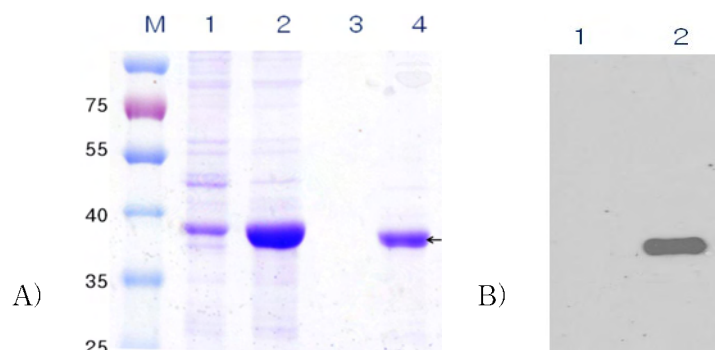


Fig.1. SDS-PAGE of the overexpressed and His-tag purified of recombinant VP-SBV protein.

pET32a+VP-SBV in Rosetta(DE3)pLysS was cultured until OD600= 0.7 and collected 4 hours after induction by IPTG. Proteins were loaded on SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue. Panel A is a 12% SDS -PAGE stained with Coomassie blue showing the total protein profile of E.coli Rosetta(DE3)pLysS expressing rVP-SBV. Panel B is Western blot of the same SDS-PAGE as revealed probing with an anti-His-Tag antibody. M=protein ladder marker (T&ITM ACCU-eco Pre-stained Marker, Korea); 1= total cell lysate from noninduced E.coli; 2= total cell lysate from induced E.coli; 3= His-tag purified total E.coli protein; 4= His-tag purified rVP-SBV fusion protein. Black arrow indicates the rVP-SBV fusion protein at 37 kDa.

(2) SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 선발

Table 1: Isotypes and reactivity of monoclonal antibodies (MAbs) anti-recombinant, and native VP-SBV in ELISA, dot-blot and Western blot.

MAbs (classes)	Reactivity against rVP-SBV			Reactivity against VP-SBV-infected	
	ELISA ng/well	WB band Size	Dot blot pg/spot	WB band size	Dot blot ng/spot
8F8 (IgG1)	~2.55	38	~251	18	~4.12
8G8 (IgG1)	~7.81	38 and 11	~425	18	~16.33
7D1-6 (IgG2a)	~2.87	38 and 11	~383	18 and 25	~5.26
7D2-6 (IgG2b)	~3.54	38	~544	Non	-
7H1 (IgG2b)	~5.46	38 and 11	~871	18 and 25	~10.1

(3) SBV-Capsid 단일클론항체들의 항원 특이도

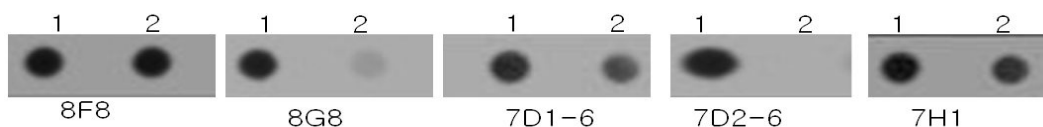


Fig.2. analyze the specificity of MAbs using dot blot

Lysates of Rosetta E.coli containing rVP-SBV (1), and homogenates of honeybees infected by SBV (2) were spotted ($2\mu\text{l}/\text{spot}$) onto a nitrocellulose membrane and treated with MAbs: 8F8, 8G8, 7D1-6, 7D2-6 and 7H1.

(4) Native 항원에 대한 SBV-Capsid 단일클론항체의 항원 특이도

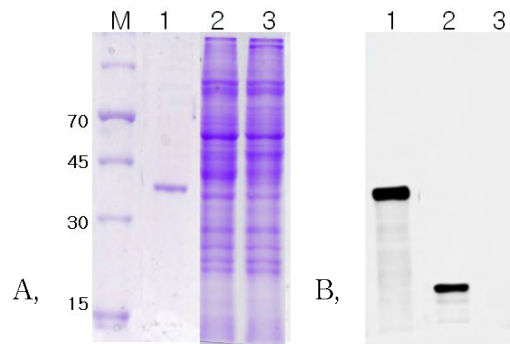


Fig.3. Detection of native SBV major capsid protein from honeybee homogenate by western blot using the recombinant 8F8 MAb against rVP1-SBV. Panel A shows a 12 % SDS-PAGE stained with coomassie brilliant blue; panel B shows a PVDF membrane using the MAb 8F8. M=protein ladder marker (Fermentas, Germany); 1=purified rVP-SBV; 2= tissues homogenate from honeybee infected SBV; 3= homogenate from honeybee noninfected SBV.

(5) 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체의 교차반응성

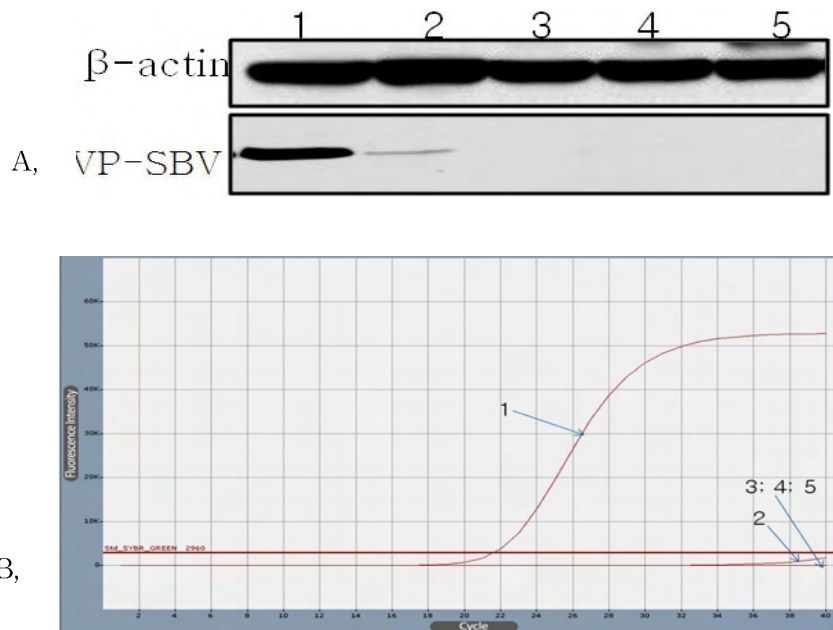


Fig.4. Cross-reactivity of MAbs, homogenates of honeybees infected by Deformed Wings virus (DWV); Korea Sacbrood virus (KSBV); Black Queen cell virus (BQCV); Israeli acute paralysis virus (IAPV) were applied to investigate the possibility of non-specific recognition of MAbs. 1=SBV; 2=KSBV; 3=DWV; 4=IAPV; 5=BQCV.

(6) 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체들의 민감도

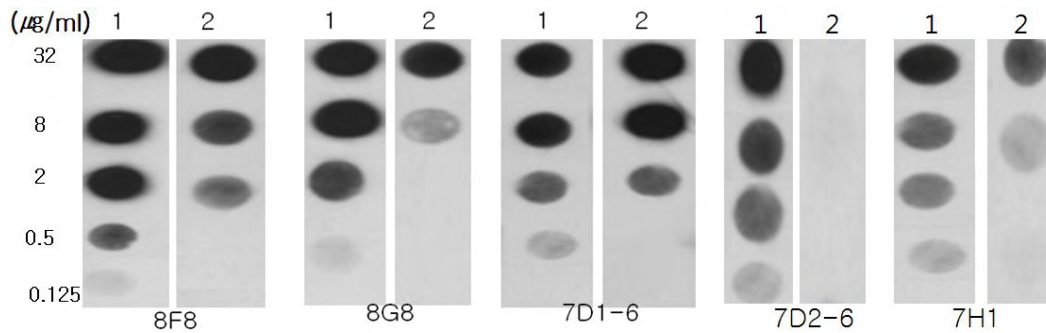


Fig.5. sensitivity of VP-SBV detection by dot blot using MAbs

(1) lysate of Rosetta E.coli containing VP-SBV; (2) honeybee homogenate from bees infected by SBV, were used as antigen, and were serially diluted and spotted on to each circle grid of the nitrocellulose membrane.

(7) 감염시료에 대한 SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 적용

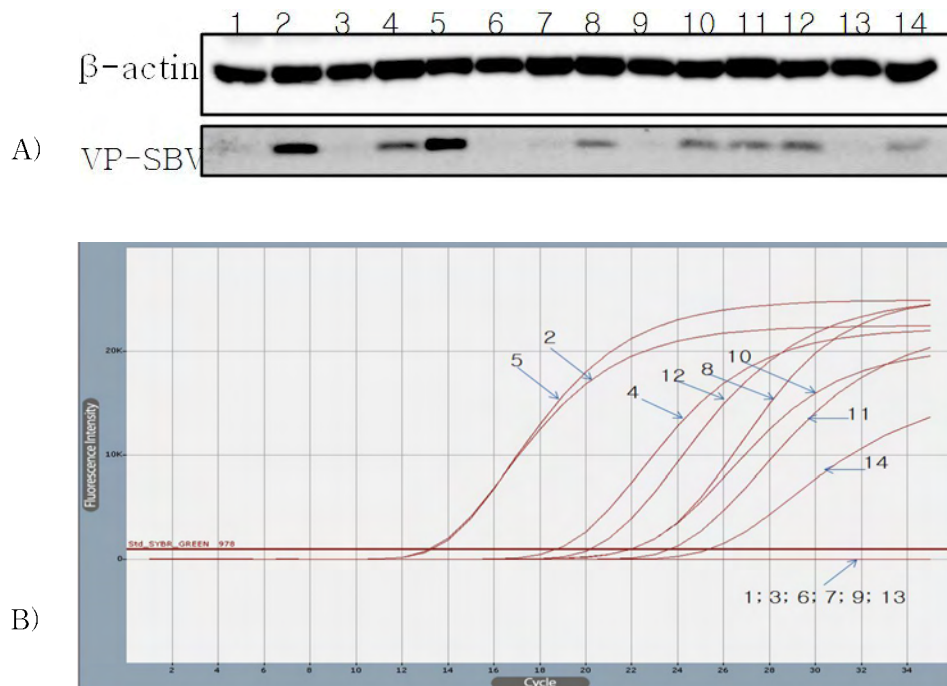


Fig.6. field detection of SBV based on recombinant 8F8 MAb.

(A) Western blot detection using 8F8 MAb, (B) real time detection using F/R-249 SBV primers (Phu et al 2010). 1-14= named samples 1-14, respectively.

제 9 절 IAPV 검사를 위한 신규 검출법의 개발

1. 초고속 PCR법을 이용한 IAPV (Israel acute paralysis Virus) 신속 진단법 개발

가. 서론.

본 연구는 꿀벌의 병원체인 IAPV (Israel acute paralysis Virus)를 가장 빠르게 검출하고자 하는 목적으로, 초고속 PCR법(Ultra-rapid PCR)을 적용하여 신규 개발한 것이다. 총 30회전의 PCR검출을 7분 34초에 마칠 수 있었으며, 검체의 양/음성의 판정은 10분이내에 가능하였다. 본 내용은 현재 Journal of Virological methods에 투고되어 심사 중의 것으로, 본 보고에서는 그 결과를 중심으로 발췌하여 전제한다.

나. 결과 및 고찰.

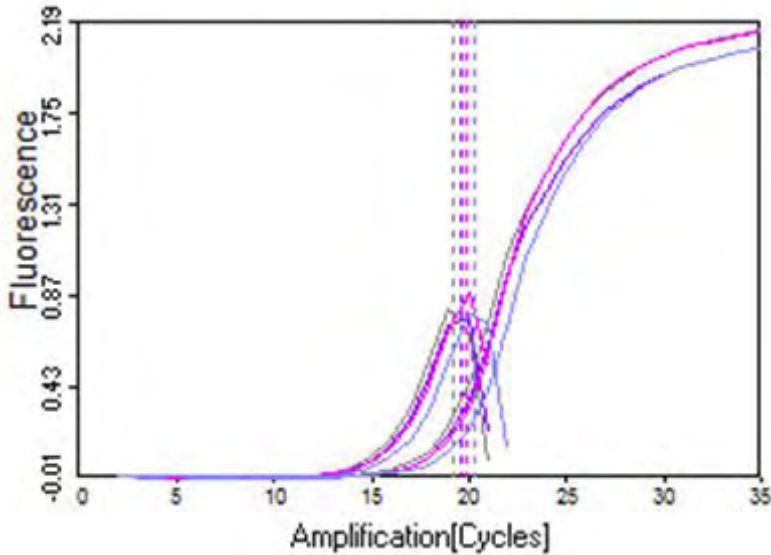
(1) 선발된 IAPV 특이 primer와 그 염기서열

Table 1. The sequence of IAPV specific primer.

Primer No.	Primer Name	Primer Sequence (5'→3')	PCR Product (bp)	Original Sequence (Position)	Reference	
1	IAPV-URRT203F	aca ata tgc aaa gga tca cc	203	EF219380 (3257-3459)	This study	
	IAPV-URRT203R	cat cca act ccc aga att ta				
2	IAPV-gp1-203F	tgg cta tgc tct gat gga ca	203	EF219380 (3345-3547)		
	IAPV-gp1-203R	act aaa acc acg cga tga cg				
3	IAPV-RT-F	cac gat aag tgc cct gaa ttg g	147	EF219380 (2934-3080)		
	IAPV-RT-R2	gcc gca ggc atc ata cac a				
4	IAPV-gp1-197F	tca gaa aat ggc aag tgg tg	197	EF219380 (3170-3366)		
	IAPV-gp1-197R	tct gtc cat cag agc ata gcc				
5	IAPV-162PF	aac gac ccg aac aaa aac ac	162	EF219380 (2917-3078)		Kim et al., 2008
	IAPV-162PR	cgc agg cat cat aca caa ct				
6	IAPV-113PF	gaa aca ggc aat taa gcg tca	113	EF219380 (3371-3483)		
	IAPV-113PR	gca ttc cac gta aat cga gag				

(2) IAPV 특이 초고속 PCR 검색법을 위한 primer쌍의 선발

A.



B.

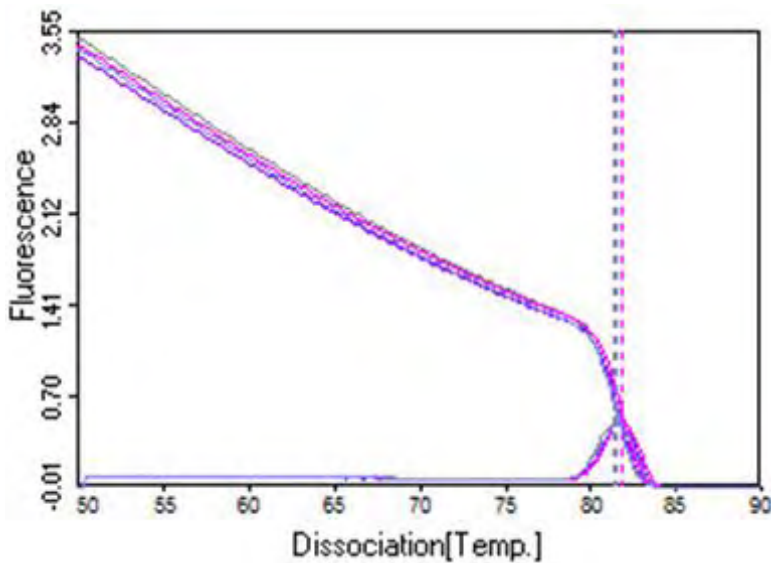
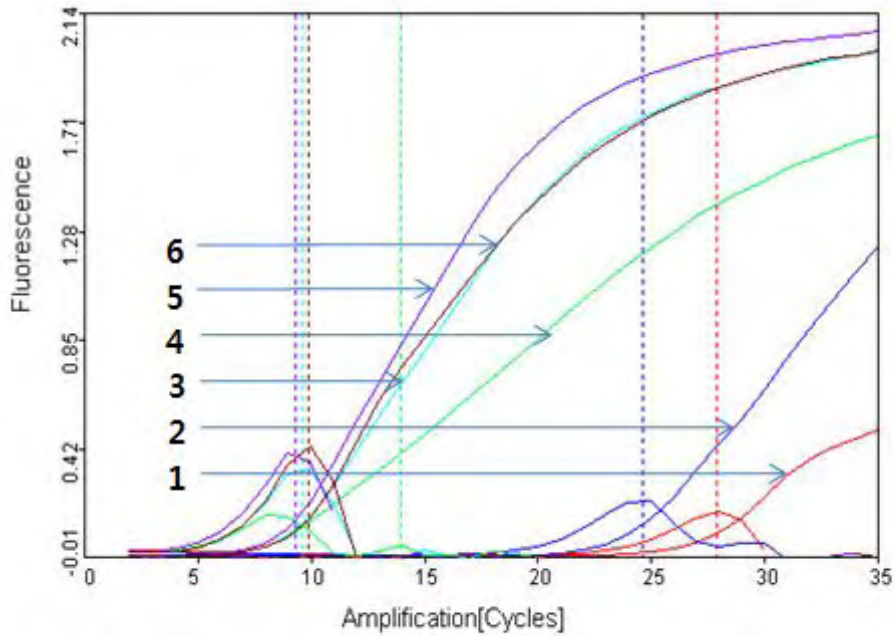


Figure 1. The primer selection for ultra-rapid real-time PCR using six kinds of primer set.

Panel A shows fluorescence curves of URRT PCRs with six kinds of primer set. The highest specific and sensitive primer set was evaluated (No. 5; IAPV-162PF and IAPV-162PR). Panel B is an image of electrophoresis of same PCR products. Lane M is molecular size marker (2.84, 1.39, 1.08, 0.816, 0.29, 0.084 kb); lane 1, IAPV-URRT 203F/R (203bp); lane 2, IAPV-gp1-203F/R (203bp); lane 3, IAPV-RT-F/R2 (147bp); lane 4, IAPV gp1-197F/R (197bp); lane 5, IAPV 162PF/PR (162bp); lane 6, IAPV 113PF/PR (113bp), respectively.

(3) IAPV 특이 초고속 PCR 검색법을 위한 최적 혼성 온도.

A.



B.

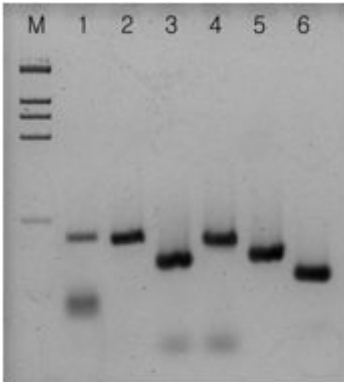
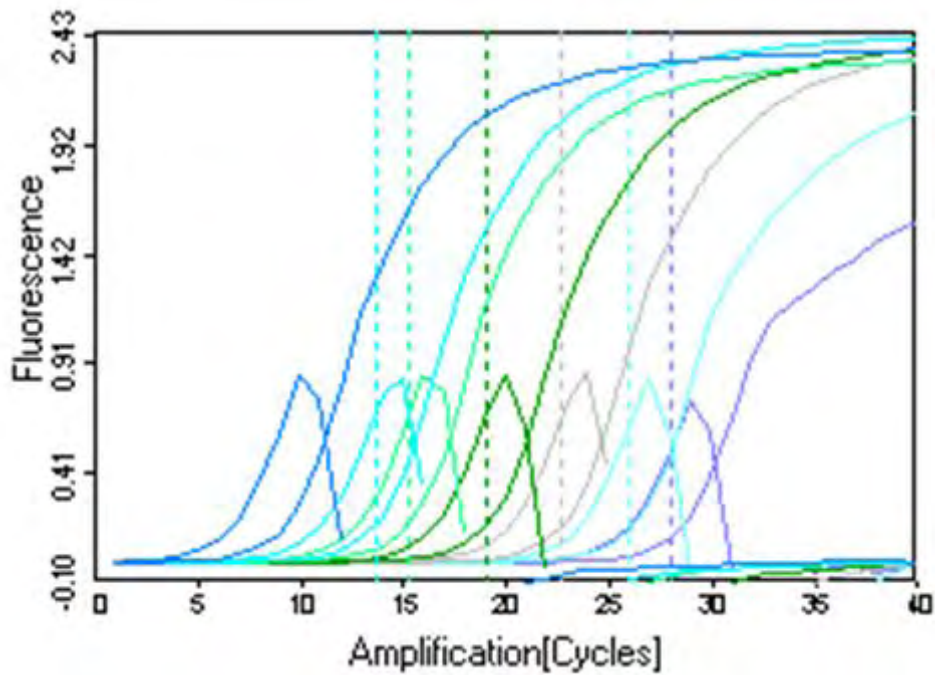


Figure 2. Optimal annealing temperature of IAPV ultra-rapid real-time PCR using IAPV 162PF/PR primer set. PCR was performed under the following condition of 94°C, 100sec pre-denaturation/ 94°C, 10sec; 54-64°C gradient, 10sec; 72°C, 10sec; 40cycles/ 50-94°C melting curve analysis. Panel A shows gradient PCR graph to search optimal annealing temperature of IAPV detection primer pair. At the annealing temperature of 60°C, the detection primer shows the fastest CT value. Panel B was melting temperature analysis (dF/dT) of ultra-rapid real-time PCR.

(4) IAPV 특이 초고속 PCR 검색법의 민감도.

A.



B.

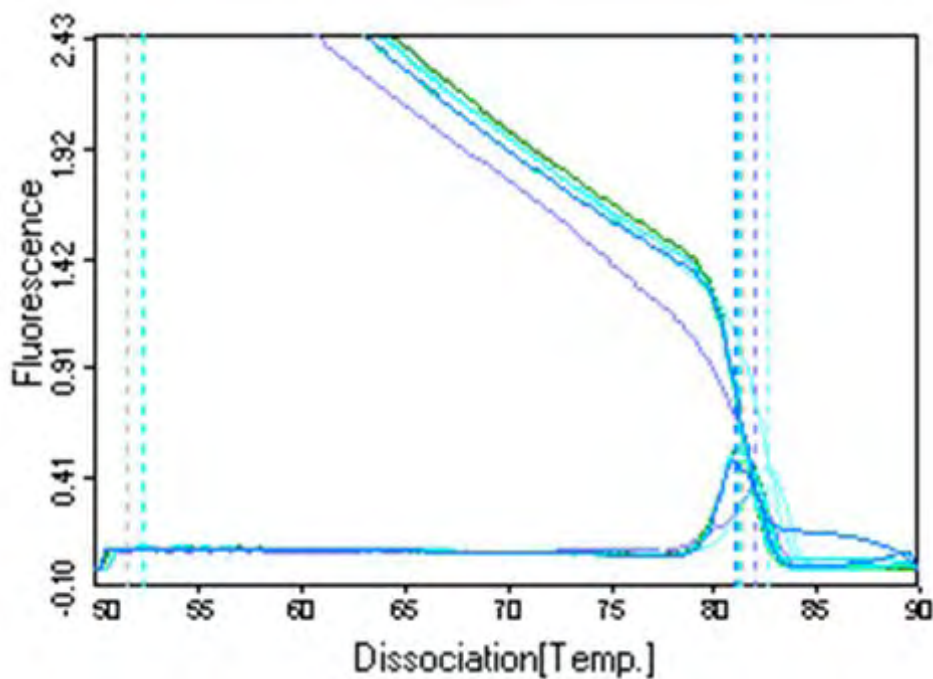
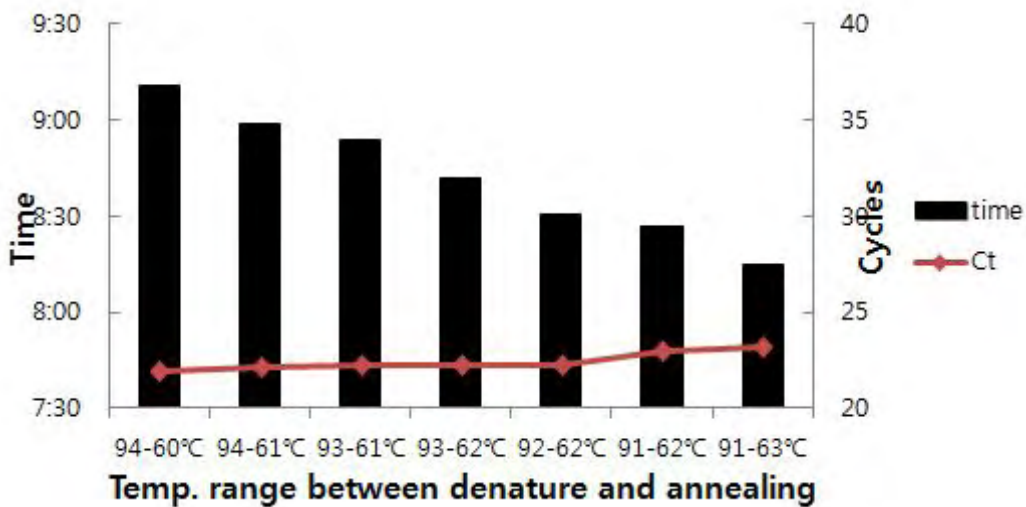


Figure 3. Sensitivity test for the detection primer set with serially diluted pBX-IAPV. Each URRT PCR was performed under the standard condition with different quantities of initial template DNA. Initial templates were used from 10^8 to 10^2 copies of pBX-IAPV, respectively. The C_T values were shown in initial quantity of template-dependent manner in the range of 10^8 - 10^2 copies. Panel

Aisfluorescenceintensitycurvesofemplatelimt diluted URRT PCR. Panel B is the result of melting analysis of same PCR products in the range of 50-90°C. All PCR products were identical, depend on the temperature of midpoint (T_m), calculated in range of $81.56 \pm 0.57^\circ\text{C}$.

(5) IAPV 특이 초고속 PCR 검색법을 위한 온도 조건의 변화

A.



B.

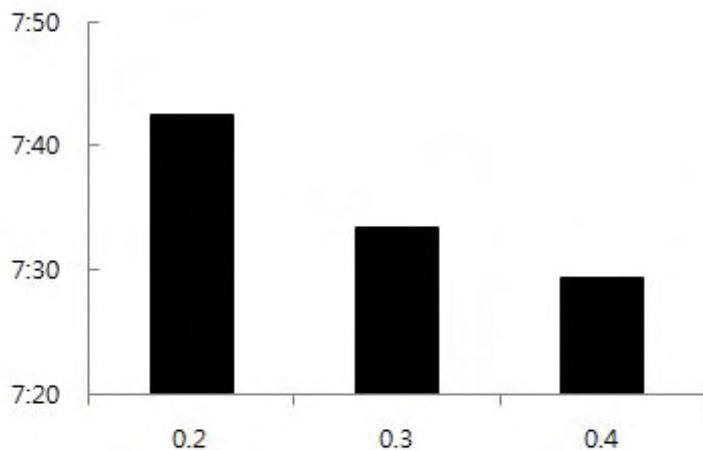


Figure 4. Relationship among denaturation and annealing temperature, ramping rate and temperature range of the melting temperature analysis in URRT PCR condition to reduce detection time. Relationship among temperature range of the melting temperature analysis and ramping rate of the melting temperature analysis in URRT PCR condition to reduce detection time. Each reaction was performed in various conditions to reduce the detection time: denaturation, annealing temperature and temperature interval between denaturation

and annealing temperature. The cycling temperature condition was as follows; 30 cycles of 1 s at 91 - 94°C, 1 s at 60 - 63°C, and 3 s at 72°C. At the temperature of the lowest denaturation temperature (91°C) and the highest annealing temperature 63°C, we could confirmed the shortest detection time (8min 15sec). After that each reaction was performed in various conditions to reduce the detection time: temperature range of the melting temperature analysis and ramping rate of the melting temperature analysis. Temperature range and ramping rate of the melting temperature analysis was examined from 75-85°C to 79-85°C and 0.2°C, 0.3°C and 0.4°C. The confirmed minimal detection time was 7min 34sec.

(6) 다양한 초기 기질량에 따른 IAPV 특이 초고속 PCR 검색법의 검출한계

Table 2. Detection limit of IAPV-specific Ultra-rapid real-time PCR using different quantities of initial template.

Initial template	Elapsed time	C _T value	T _m value
10 ⁸ copies of pBX-IAPV	36:29	10.21	80.99
10 ⁷ copies of pBX-IAPV	36:28	14.61	81.13
10 ⁶ copies of pBX-IAPV	36:33	16.29	81.12
10 ⁵ copies of pBX-IAPV	36:09	19.99	81.14
10 ⁴ copies of pBX-IAPV	35:55	23.77	81.31
10 ³ copies of pBX-IAPV	36:09	26.93	82.59
10 ² copies of pBX-IAPV	36:25	29.18	82.00
10 ¹ copies of pBX-IAPV	36:20	28.94	81.57
10 ⁰ copies of pBX-IAPV	36:09	28.86	82.20

(7) 다양한 PCR조건에 따른 IAPV 특이 초고속 PCR 검색법의 최소 검사시간

Table 3. Ultra-rapid real-time PCR condition to reduced detection time.

PCR condition	C _T value	T _m value	Elapsed time
94°C 1s, 60°C 1s, 72°C 3s	21.92	82.38	9:11
94°C 1s, 61°C 1s, 72°C 3s	22.13	82.44	8:59
93°C 1s, 61°C 1s, 72°C 3s	22.20	82.52	8:54
93°C 1s, 62°C 1s, 72°C 3s	22.20	82.34	8:42
92°C 1s, 62°C 1s, 72°C 3s	22.27	82.50	8:31
91°C 1s, 62°C 1s, 72°C 3s	22.98	82.38	8:27
91°C 1s, 63°C 1s, 72°C 3s	23.19	82.05	8:15

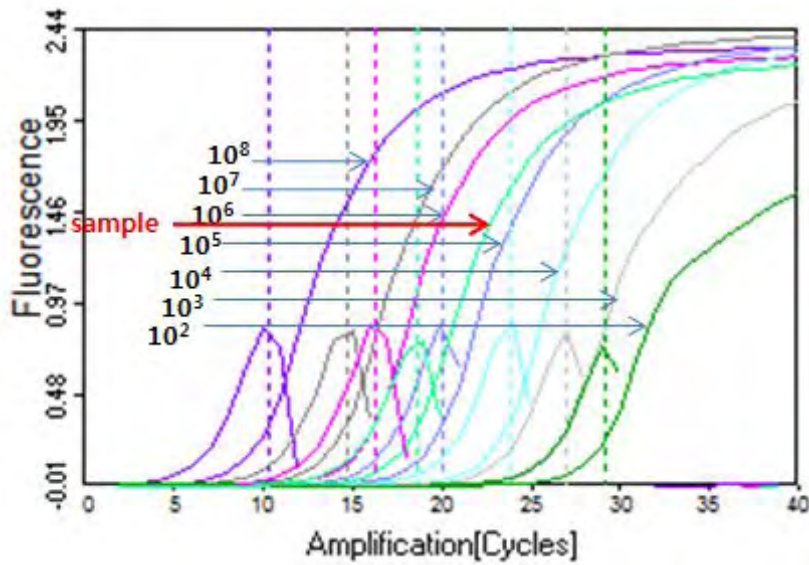
(8) 다양한 PCR 온도 조건에 따른 IAPV 특이 초고속 PCR 검색법의 최소 검사시간

Table 4. Ultra-rapid real-time PCR condition to reduced detection time.

Melting range	Ramping rate	C _T value	T _m value	Elapsed time
75-85°C	0.2°C/sec	23.19	82.05	8:15
79-85°C	0.2°C/sec	23.92	82.63	7:43
79-85°C	0.3°C/sec	23.90	82.84	7:34
79-85°C	0.4°C/sec	23.03	-	7:30

(9) 감염시료에 대한 IAPV 특이 초고속 PCR 검색법의 적용

A.



B.

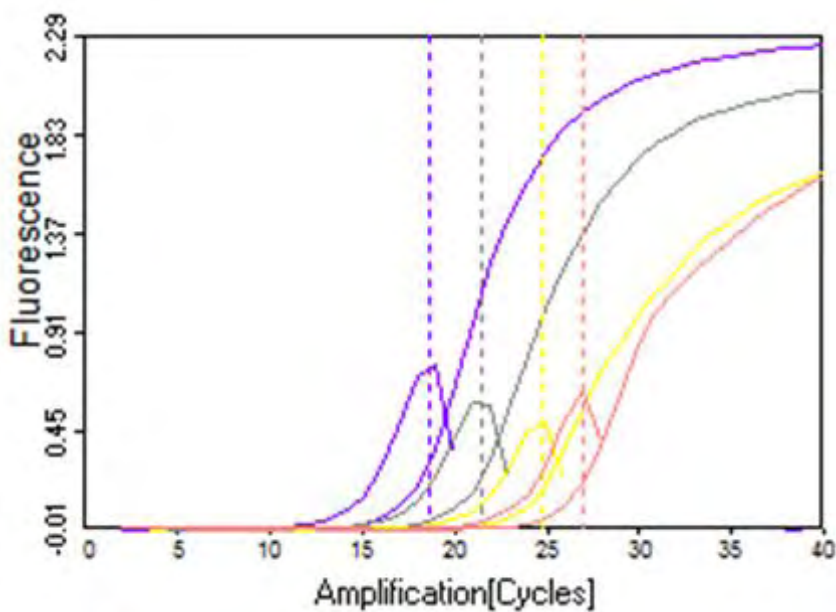


Figure 5. Sensitivity test for the detection primer set with serially diluted honeybee samples.

Confirmed PCR condition was applied to IAPV URRT PCR using serially diluted cDNA from IAPV infected honeybee samples. The quantities of loaded virus were calculated into from around 5×10^5 to 5×10^2 . All PCR products were identical, depend on the temperature of midpoint (T_m).

2. RT-LAMP법을 이용한 IAPV (Israel acute paralysis Virus) 신속 진단법 개발

가. 서론.

본 연구는 꿀벌의 병원체인 IAPV (Israel acute paralysis Virus)를 현장에서 쉽고 정확하게 검출하고자 하는 목적으로, 역전사-등온증폭법(Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification)을 적용하여 신규 개발한 것이다.

본 내용은 Journal of Apiculture (2011), 26(2)에 “IAPV내의 capsid protein gene의 검출을 위한 RT-LAMP 법의 개발”의 제목으로 발표된 것으로, 본 보고에서는 그 결과를 중심으로 발췌하여 진재한다.

나. 재료 및 방법.

(1) 본 연구에서 선발된 primer들과 그 염기서열

Table 1. The four specific primers for IAPV-RT-LAMP

name	Sequence (5'→3')	mer	T _m (°C)
IAPV-VP2-F3	GTTATAGGATTACCGTGGTGA	21	56
IAPV-VP2-B3	GAACACGTATTGTAACCTTCTGT	22	56
IAPV-VP2-FIP	TGACGGGTATCACTCCTGGTTTTTAGACAGCTTTTCATACT GGC	44	59
IAPV-VP2-BIP	CATTGGGCCCGATCAGGATCTTTTAGTCAGGTCCAAAATGT ACT	44	58

(2) 본 연구에서 선발된 primer들의 IAPV유전자 중의 위치

다. 결과 및 고찰.

(1) IAPV-RT-LAMP의 최적 반응온도

```

ATGATTGGGGCGGTGTAATACCAGTGGGAATGCCTTGTATTCTAAATCCATT
AGAACTACAAGTATTTTCAGAAACGGAAAATCGTGAAACTGAAGTCATAGAT
GCCGCTCCATGTGAATATGTTGCTAACATGTTCTCGTATTGGCGTGCAACTAT
GTGTTATAGGATTACCGTGGTGAAGACAGCTTTTCATACTGGCAGACTTGA
      IAPV-VP2_F3                    IAPV-VP2-FIP
GATTTTCTTTGAACCAGGAGTGATACCCGTCAAACCCACTGCAAATAACATT
      IAPV-VP2-FIP
GGGCCCGATCAGGATCAACTCACAGGAGCGGTGGCTCCTTCCGATAATAAC
      IAPV-VP2-BIP
TATAAGTACATTTTGGACCTGACTAATGATACAGAAGTTACAATACGTGTTCC
      IAPV-VP2-BIP                    IAPV-VP2-B3
TTTTGTTTCAAATAAGATGTTCCCTTAAGACTGCTGGAATCTATGGTGCTAATA
GTGAAAATAACTGGAACCTTT//CATGAATCCTTTACTGGATTCTTGTGTATAA
GACCAGTCACTAAATTGATGGCTCCTGATACTGTGTCTGACAATGTATCTATA
GTTGTTTGGAAATGGGCAGAAGACGTA

```

Figure 1. Sequences and locations of four primers for IAPV-RT-LAMP. The six locations of motifs for primers and loops for the LAMP are denoted underlines.

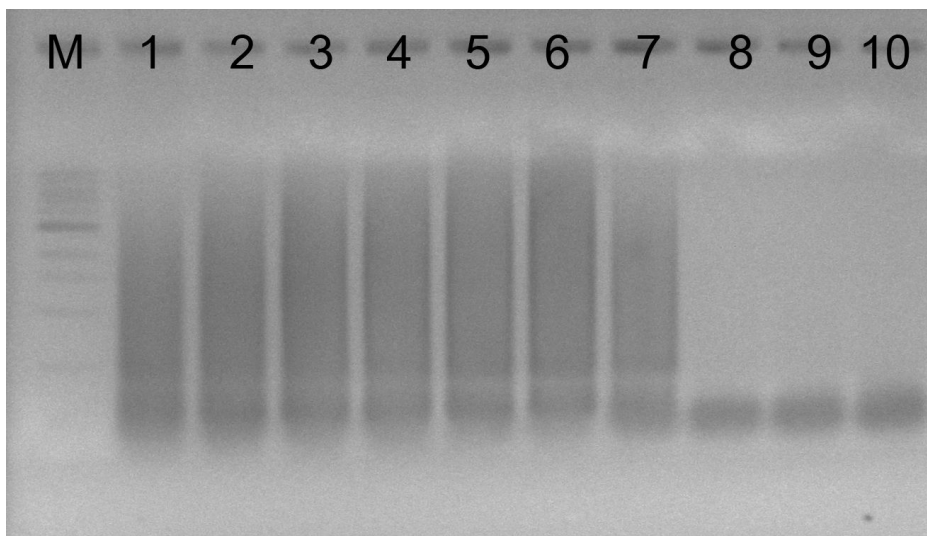


Figure 2. Optimal reaction temperature of IAPV-RT-LAMP

LAMP was performed under range of 45.0 °C to 60.0 °C as reaction temperature. Lane M is 1 kb ladder (NEB, USA). Lanes 1 to 10 are LAMP products at 45.0 °C, 46.3 °C, 47.5 °C, 49.2 °C, 51.4 °C, 53.9 °C, 56.0 °C, 57.7 °C, 58.8 °C and 60.0 °C, respectively. LAMP products are shown in lanes 1 to 7. Optimal reaction temperature was determined as 54 °C in lane 6.

(2) IAPV-RT-LAMP의 최적 반응 조건

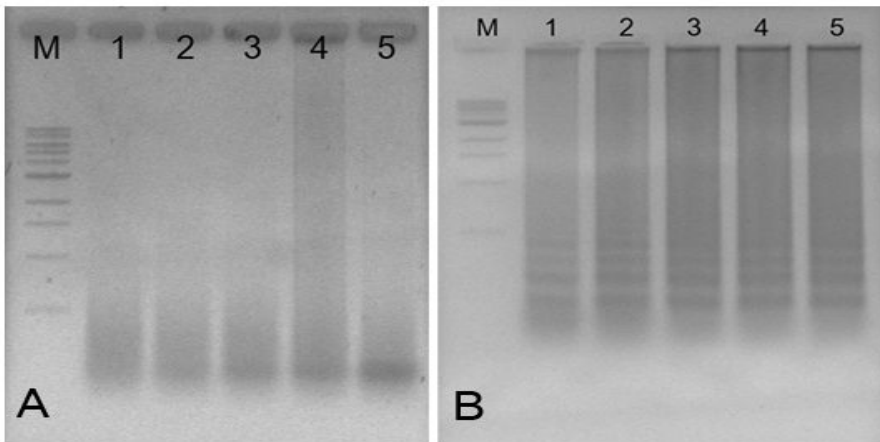


Figure 3. Optimal condition of IAPV-RT-LAMP

Panel A. Optimal primer concentration. Lane M is 1kb ladder (NEB, USA). Lane 1 to 5 were used different concentration of inner primer as 1, 2, 3, 5, 10mM respectively. Lane 4 was only amplified. Panel B. Optimal dNTP concentration. Lane M is 1kb ladder (NEB, USA). Lane 1 to 5 were used different concentration of dNTP as 5, 10, 20, 30, 50mM respectively.

(3) IAPV-RT-LAMP의 최소 검출 시간

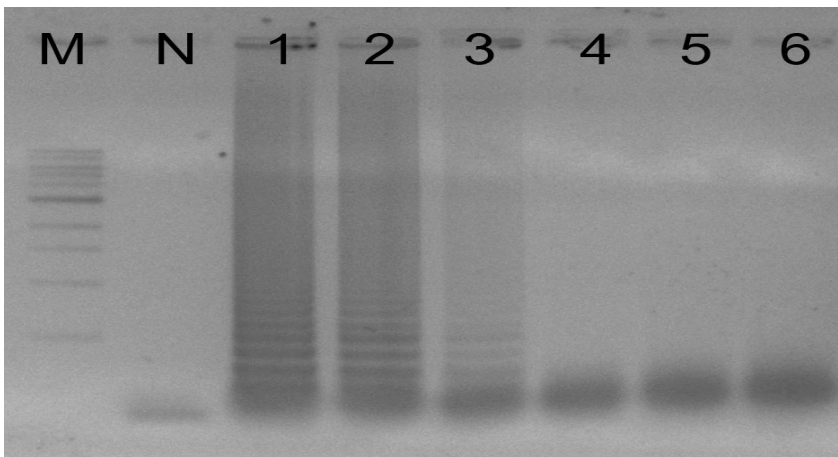


Figure 4. Determination of minimum reaction time of IAPV-RT-LAMP. LAMP was performed under range of 60min to 10min. Lane M is 1kb ladder marker (NEB, USA). Lane N is negative control as no reaction time. Lanes 1 to 6 were carried out at 60, 50, 40, 30, 20 and 10min, respectively. LAMP products could be amplified in 40min reaction time

(4) IAPV-RT-LAMP의 민감성

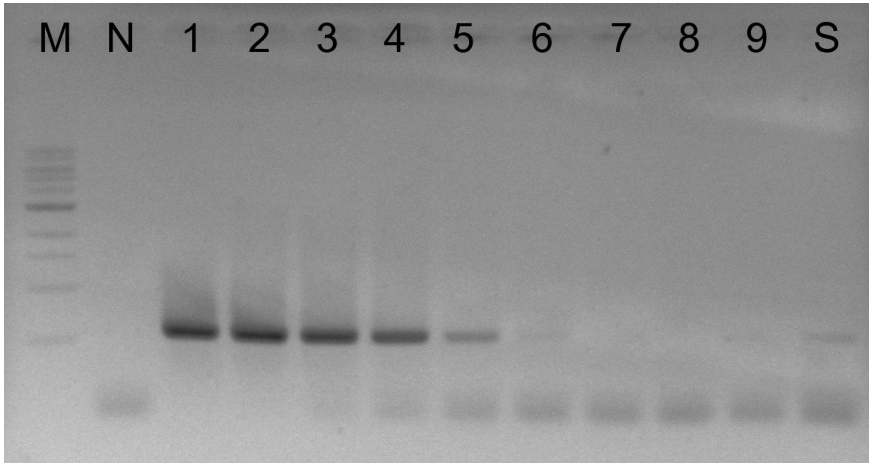


Figure 5. Target mRNA concentration in total RNA

Lane M is 1kb ladder marker (NEB, USA). Lane N is negative control as no template. Lanes 1 to 9 were carried out using 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 and 10^0 copies of diluted template DNA, respectively. Lane S is cDNA as template.

(5) IAPV-RT-LAMP의 현장검사를 위한 시각화

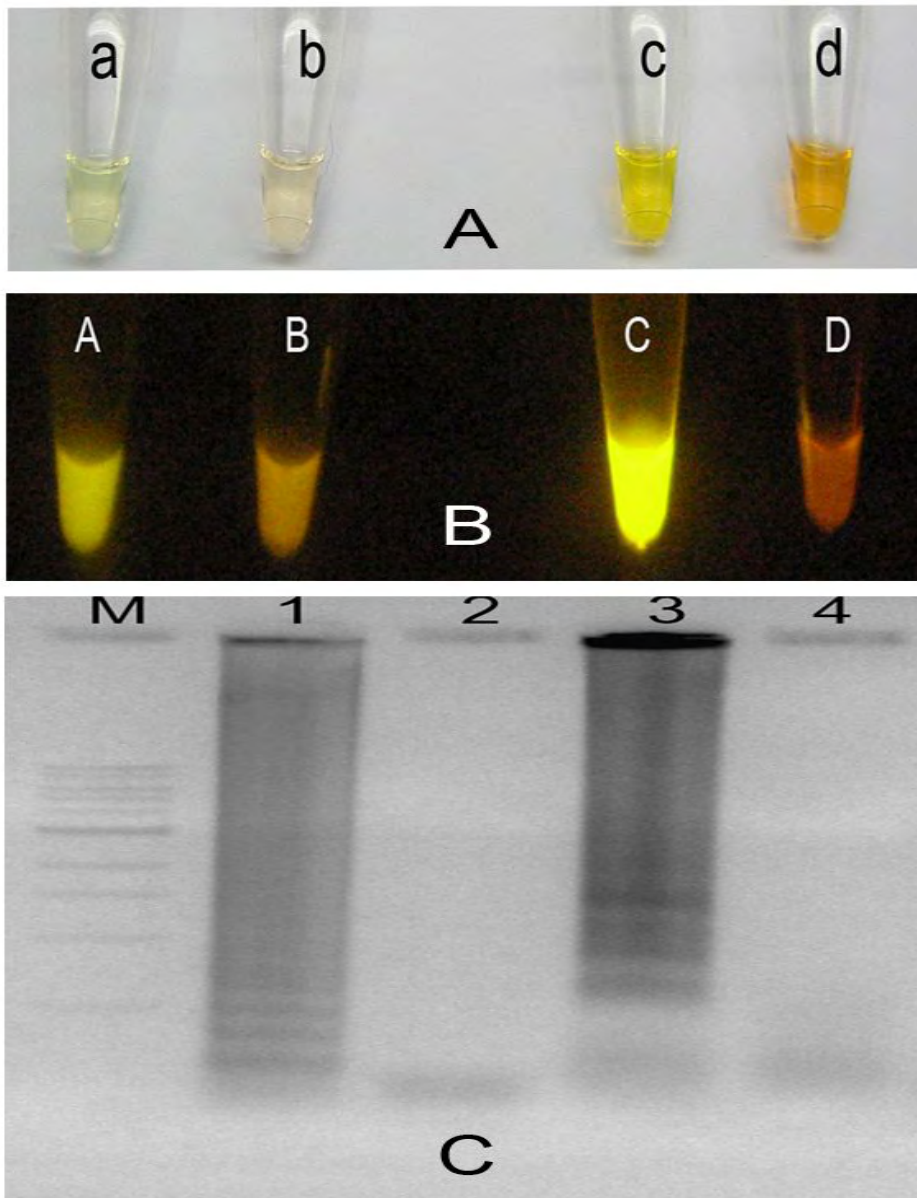


Figure 6. Visual inspection of IAPV-RT-LAMP using fluorescent dye

Visual inspection of LAMP amplification products in the reaction tubes was performed by adding fluorescent dye, SYBR Green I and GeneFinder™ to reaction mixture. Tubes a and b (A and B) are reaction tubes adding SYBR Green I, tubes c and d (C and D) are reaction tubes adding GeneFinder™ each positive and negative reaction, respectively. Panel A. Fluorescence under daylight. Positive reaction tubes appeared Yellow and negative reaction tubes appeared orange with white background. Panel B. Fluorescence under UV light. Positive reaction tubes appeared fluorescence but negative reaction tubes not appeared fluorescence. Panel C. Electrophoresis of reaction tube. Lane M is 1kb ladder (NEB, USA). Lane 1 and 2 are reaction added SYBR Green I, Lane 3 and 4 are reaction added GeneFinder™ each positive and negative reaction, respectively.

(5) IAPV-RT-LAMP의 재현성

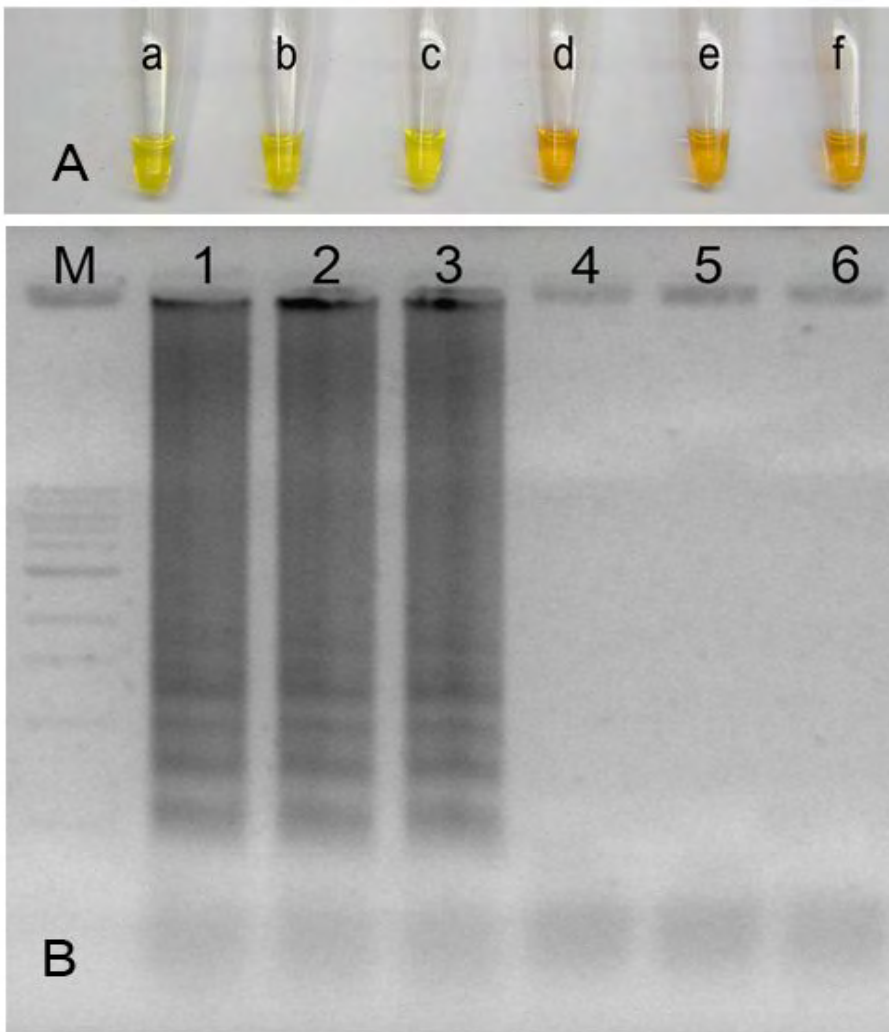


Figure 7. Result of the IAPV-RT-LAMP analysis using a water bath to replace the thermocycler.

All products in reaction tubes were added X1000 GeneFinder™. Panel A. Fluorescence under daylight. Tubes a to c are positive reaction tube each sample. Tubes d to f are negative reaction tube as no template. Positive reaction tubes appeared Yellow and negative reaction tubes appeared orange with white background. Panel B. Confirmation of amplification using Electrophoresis. Lane M is 1kb ladder (NEB, USA). Lanes 1 to 3 are positive reaction, lanes 4 to 6 are negative reaction , each 3 samples, respectively.

3. RNA-dependent RNA Polymerase(RdRP) 서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰

가. 서론

꿀벌은 세계 식량작물의 수분 매개 활동에 주요한 역할을 담당하며, 그에 의해 세계 식량의 25%가 생산된다. 또한 양봉 사업을 통해 각종 기능성 식품은 물론 각종 질병 치료제들도 제공하고 있어(Morse and Calderone, 2000; Klein et al., 2007), 그 중요성은 날로 커져가고 있다.

꿀벌 질병은 직접적인 경제적인 피해를 유발하는 주요 원인중 하나로, 여러 개체들이 군집을 형성하여 사는 특성으로 인해 더 심한 결과를 초래한다. 현재까지 꿀벌에 발생하는 바이러스성 질병은 Deformed Wing Virus(DWV), Acute bee paralysis virus(ABPV), Black Queen Cell Virus(BQCV), Sacbrood Virus(SBV), Kashmir Bee Virus(KBV), Israeli Acute Paralysis Virus(IAPV)등으로 18종 이상이 병원성 바이러스로 밝혀져 있다(Allen and Ball, 1996, Eyal et al., 2007 Govan et al., 2000).

이들 중 IAPV, ABPV, Kashmir Bee Virus(KBV), SBV 및 BQCV에 대해서는 완전한 genome sequence가 밝혀져 있다(Benjeddou et al., 2001, de Miranda et al., 2004).

2006년 후반 미국에서 일벌의 30% 이상이 사라지는 현상인 봉군붕괴현상 (Colony Collapse Disorder; CCD)이 보고되었으며, 현재까지 세계적으로 약 25% 이상의 일벌이 사라졌다고 보고되었다(van Engelsdorp et al., 2007).

이러한 꿀벌의 실종 현상은 식량의 수분매개를 감소시켜 식량난을 야기시키는 심각한 결과를 초래할 수 있다. 세계적으로 CCD에 관한 관심이 높아지면서 많은 연구가 이루어지고 있다. 하지만 그 정확한 원인이 밝혀지지 않은 가운데, 2007년 CCD의 원인 규명을 위한 Metagenome 분석연구(Cox-Foster et al., 2007)에서 IAPV가 CCD의 가장 유력한 원인으로 제시되었다.

IAPV의 genome 분석은 1995년 Stoltz등에 의하여 이미 완료되었고, 이를 토대로 국내에서도 IAPV 검출법에 대한 연구가 이루어져왔다(강. 등., 2008; 유. 등., 2008; 최. 등., 2007). IAPV는 변이성이 높은 RNA 주형의 바이러스이며, 같은 Dicistrovirida과 내의 Kashmir Bee Virus와 염기서열이 97%의 높은 상동성을 보여(de Miranda et al., 2004; Maori et al., 2007) 검출상의 오류를 야기시킬 수 있으며, 이들 바이러스들을 정확히 검출하기 위한 연구가 지속적으로

수행되어지고 있다(강. 등., 2008; 유. 등., 2008; 최. 등., 2007; 노. 등., 2010).

전체 genome 서열의 RNA dependent RNA Polymerase(RdRP) region은 DNA stage를 가지지 않는 바이러스를 포함한 모든 RNA의 genome을 암호화하는데 필수적인 단백질이며, 바이러스의 RNA 주형을 기반으로 상보적인 RNA 가닥의 합성을 촉진시키는 효소이다.

본 연구에서는 변이성이 높은 IAPV의 특성에 따라 주형 RNA의 합성을 주관하는 RdRP region에서도 변이성이 있는지 확인하고 나아가 그 유용의 가능성을 보고자, 경기대 양봉장에서 수집된 IAPV 감염으로 사멸한 꿀벌의 사체를 이용하여 RdRP region을 클로닝하고 sequence 분석을 통하여, RdRP region의 변이성 및 그에 기반한 계통분류학적 고찰을 하여보고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 꿀벌 시료

본 연구에서 사용된 꿀벌 시료는 경기대학교 양봉장에서 육종되는 *Apis Mellifera*으로 임상적 증상을 나타내고 성충을 수집하였다. 수집된 시료들은 PCR 검사를 수행하여 진단을 실시하였고, IAPV의 감염이 의심되는 시료들을 선별하여 연구에 사용하였다.

(2) Total RNA Extraction

수집된 꿀벌 시료로부터 Total RNA를 순수 분리하였다. MagNA Lyser Green Beads(Roche, Switzerland)에 날개를 제거한 꿀벌 세 마리를 넣고, Lysis buffer 1ml와 Chloroform 200 μ l를 첨가하여 6,000rpm, 60초의 조건으로 파쇄를 진행하였다. 이후 과정은 Total RNA Extraction kit(Intron, Korea)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행되었고, 추출된 Total RNA는 분광광도계(Eppendorf, Germany)로 농도를 측정하여 Reverse Transcription 과정에 사용하였다.

(3) Reverse Transcription

추출된 Total RNA중 3,000ng을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 3,000ng의 Total RNA가 포함된 용액에 100pmol oligo dT를 첨가하여 최종 volume을 50 μ l로 조정하였고, 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치하였다. 정치 후, 즉시 ice로 옮겨 5분간 정치하여 4 $^{\circ}$ C로 온도를 조정하였다. 얼음에 정치

된 반응액에 100mM DDT, 10mM dNTP(each 2.5mM), RNase inhibitor, RocketScript Reverse Transcriptase(10,000U), 5X reaction buffer를 첨가하여 40℃에서 60분간 정치하여 반응하였다.

(4) IAPV RdRP 유전자에 대한 특이 Primer Design

GenBank에 등록된 IAPV의 complete genome sequence(Accession No. NC_009025, Fig. 1)를 바탕으로 RdRP 전장을 증폭하도록 IAPV-RdRP용 특이 프라이머를 설계하였고, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 특이성 및 다른 염기서열과의 상동성을 비교하였다.

각 oligonucleotide의 제작은 바이오닉스(Bionics, Korea)에 의뢰하였으며, 각 프라이머들은 IAPV-RdRP-F, IAPV-RdRP-R로 명명하였다(Table 1).

Table 1. Sequence of specific IAPV-RdRP primers

Name	Sequence(5' → 3')	Target
IAPV-RdRP-F	TGCGGATCCATTCTCAATGAAGATGTTA	RdRP
IAPV-RdRP-R	TAAGAGCTCACACCAGTTTGGCATTTCAA	(918bp)

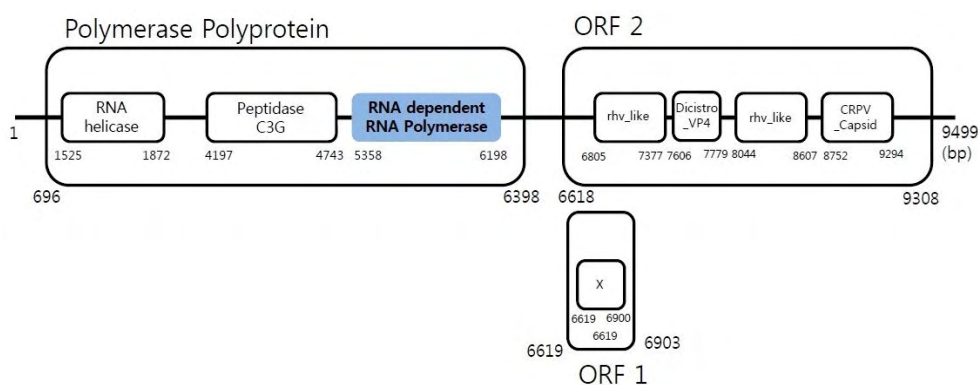


Figure 1. A schematic diagram of IAPV complete genome(Accession Nr. NC_009025) The genome sequence consists of two open reading frames(ORFs) encoding two polyproteins that ORF 1 is for non-structural polyprotein including RNA helicase, a 3C-like cysteine protease named as Peptidase_C3G, and an RNA dependent RNA Polymerase

(RdRP) and ORF 2 is for structural polyprotein.

(5) IAPV_RdRP Recombinant DNA의 제작

RT-reaction을 통해 제작된 cDNA를 Table 1에 표기된 특이 Primer를 사용하여 RdRP 유전자(전체 918bp)을 증폭하였다. PCR 조성으로는 2.5U *Taq* DNA Polymerase, 2.5mM dNTPs, 10× PCR buffer(25mM MgCl₂), 10 pmol IAPV-RdRP-Fwd/Rev, D.W로 조성하였고, 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1cycle로 하여, 40 cycle반복 수행하고, 72°C에서 10분간 post-extension을 수행하였다.

증폭된 유전자는 pDrive Cloning Vector(QIAGEN, Germany)에 삽입하여 recombinant DNA를 제작하였다. Screening을 거쳐 선별된 Positive Clone들은 pDrive-IAPV_RdRP Clone으로 명명하고, DNA 염기서열 결정을 위해 분석을 의뢰하였다(SolGent, KOREA).

(6) 염기서열 확인 및 분석

계통분류학적 분석을 위해 결정된 염기서열들은 Chromas1과 Clustal X program(Ver. 1.83) 및 NCBI에서 제공되는 BLAST를 통해 확인하였으며, GenBank에 등록된 다른 후보 유전자 염기서열과 그간에 상동성을 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) IAPV의 검출

경기대에서 수집된 꿀벌 시료에서 IAPV 감염 여부를 확인하기 위해 RNA 추출과 역전사 효소반응을 통해 합성된 cDNA를 사용하여, IAPV detection Primer(강. 등., 2008)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 꿀벌의 β -actin gene을 reference로 비교하여 역전사 효소의 작동을 확인하였으며, 특이적Detection Primer를 통해 예상되었던 570bp 크기의 증폭 산물을 확인하였다(Fig. 2).

수집된 모든 꿀벌 시료들에 대해 PCR 검사를 실시하였고, IAPV 감염 진단이 확인된 것들만 선별하여 진행하였다.

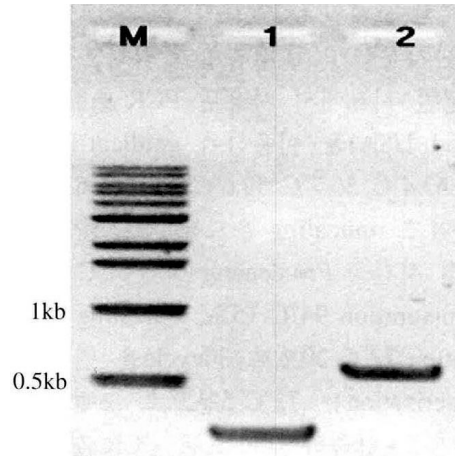


Figure 2. Detection of IAPV(Israeli Acute Paralysis Virus) in Honey bee from Kyonggi-Uni, Korea.

Total RNA extracted from the honey bees was examined for the presence of IAPV by performing of PCR. Specific detection primer pair for IAPV amplified a PCR fragment of ca. 560bp. IAPV was detected in honeybees specimen from a bee-farm at Kyonggi University, Korea. Lane M. 1kb ladder of DNA size marker; Lane 1. Positive control(β -actin of Honeybee, 230bp); Lane 2. Amplified product with IAPV-detection primer set.

(2) IAPV-RdRP Recombinant DNA 제작

Table 1.에 명시된 IAPV-RdRP primer 쌍을 사용하여 증폭된 IAPV_RdRP PCR product(918bp)를 pDRIVE vector(Qiagen, Germany)와 T-A cloning을 수행하였다. Vector specific primer를 사용하여 Screening한 후, 선별된 총 7개의 Clone들을 pDrive-IAPV_RdRP Clone Nr. X라고 명명하였다.

(3) 염기서열의 확인 및 분석

Screening을 통해 선별 후 확보된 clone들은 염기서열 결정을 위해 분석을 의뢰하고, 분석된 염기서열은 ClustalX program(ver. 1.83)과 BLAST tool을 사용하여 Primer 제작시 사용했던 IAPV complete sequence(accession. Nr. NC_009025)과 비교 분석하고, 그 후 NCBI에 등록된 다른 8개의 IAPV complete sequence(Table 2)들과도 상동성 확인에 따른 계통학적 분류를 위해 비교 분석하였다.

선별된 총 7개의 pDrive-IAPV_RdRP Clone들과 NC_009025에서 제시된 RdRP sequence (Region 5358bp-6198bp)의 비교에서 파란색으로 표기된 14개의 염기를 제외한 904개 염기가

[A]

```

C6 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
C7 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
C9 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
C12 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
C18 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
C19 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
NC_009025 ATTTCTCAATGAAGATGTTAGACTAGCCGTTCAACGACGAAATTCAGCGAGTCGGTGAAGGAAAAACGATACCTGTAAATGTGGGTTGATACATGAAAGATGAGGCGCAGCCCACTGAA
*****

C6 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
C7 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
C9 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
C12 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
C18 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
C19 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
NC_009025 AAAGTAAATCAATGAAACACCGAGTATTCCTCAATGGACCAATGGATTTCTCTAAGCTTTTTCGAAATGATATTTGGGCTTTATAGTCATTTTATGATGGAAAAATCGAATTACTAAAT
*****

C6 GAGATGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
C7 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
C9 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
C12 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
C18 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
C19 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
NC_009025 GAGGTGTCATGGAACGAAATGTTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAACACTGTCGCAAGTGGACAAATTCGAAATAAAGTTATTCGAGGTGATTTTCAACTTTTGTGGATCACTG
*****

C6 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
C7 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
C9 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
C12 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
C18 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
C19 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
NC_009025 AATGATGATATGATGGAAGAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGGAAGAAAGAAATAATCTGATCAGACATGTTGTTGATGGATGTTGATCACTCTGACACATC
*****

C6 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
C7 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
C9 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
C12 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
C18 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
C19 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
NC_009025 TGCATGATTCGCTGATATGATGACACACAGCCAAACCTCTGGAATACTGCAACAACCCCGCTCAATTCGCTTTTATTAATAGCATGGGATGCGAATGTTTTCGCAATTTGTGCT
*****

C6 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
C7 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
C9 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
C12 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
C18 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
C19 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
NC_009025 AAGAATACAGGCATAAAGATGACAATGAAGGATTTTGGTAAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGGAGATGACAATGTTATAAACTTCAGTGATGAAGTATGTAATGGTATAACATG
*****

C6 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
C7 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
C9 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
C12 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
C18 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
C19 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
NC_009025 GAAACTATGCTAAAGCTTTTGAACCCCTTGGATTCACCTATCTGATGAACTTAAGGGCGTAAATGGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTGCAGTATTTAAAACGT
*****

C6 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
C7 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
C9 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
C12 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
C18 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
C19 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
NC_009025 AAGTTTAGATACGATGAAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAATGCCAAACTGGTGT
*****

[B]
C6 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSKAFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
C7 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
C9 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
C12 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
C18 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
C19 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
NC_009025 ILNEDVRLAVQRR IQAAREGKRLPVMWVDLKDERRP I EKVNLKTRFVSNRPMDFSI AFRMYLGF I AHLNENR I TNEVSI GTNYSQDWSKT VRKLTKFGNKV I AGDFSTFDGSL
*****

C6 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
C7 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
C9 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
C12 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
C18 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
C19 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
NC_009025 NVC I MEKFA DL ANEF YD GKENN L I RHV L LMDVNSVHI CND SVYMMTHSOPSGNPAT P L NCF I NSMGLR MCF A I CAKNTG I KMTMKDF GKHVSMVSYGDDNV I NF SDEVC EYWNM
*****

C6 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
C7 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
C9 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
C12 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
C18 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
C19 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
NC_009025 ET I AKAF E TL GF Y T D E L K G V N G E V P K W R S I K D V Q Y L K R K F R Y D E Q R K W E A P L C M D T I L E M P N W C
*****

```

Figure 3. Multiple Alignment of cDNA sequence and amino acid sequence of the IAPV_RdRP gene between Reference(NC_009025) and Clones.

CXs indicate the nucleotides (A) and amino acids (B) of pDrive-IAPV_RdRP clones in this study. The reference sequence determined is corresponding to nucleotides in 5358-6198 of NC_009025 that is a IAPV complete genome sequence deposited in the GeneBank database

and amino acids in 1555-1834 of Protein ID : YP_001040002

일치하였으며(Fig. 3A), 아미노산 서열에서는 3개의 아미노산을 제외하고 일치하여(Fig. 3B) 각 97%와 98%의 상동성을 확인하였다.

본 연구에 사용한 꿀벌 시료를 통해 획득한 RdRP 염기서열의 계통적 분류를 위해 NCBI에 등록되어 있는 모든 8개의 IAPV complete genome(Table 2)의 RdRP 서열부분을 비교, 분석하였다.

Table 2. List of IAPV complete genome sequence from NCBI

Accession No.	Country	Description
NC_009025 (YP_001040002)	Israel	Israel acute paralysis virus of bees
EU224279 (ABY71754)	USA	Israel acute paralysis virus of bees from USA
EU224280 (ABY71756.1)	USA	Israel acute paralysis virus of bees from USA
EU218534 (ABY57949)	USA	Israel acute paralysis virus of bees from USA
EU436455 (ACD01401)	USA	Israel acute paralysis virus of bees strain IS1-ISRAEL-2007,
EU436456 (ACD01403)	Australia	Israel acute paralysis virus of bees strain OZ6-AUSTRALIA-2007
EU436423 (ACD01399)	USA	Israel acute paralysis virus of bees strain DVE31-OP3-PA-USA-2007
EF219380 (AAV64179)	Israel	Israel acute paralysis virus of bees

Multiple alignment 결과 상동성의 %에 따라 두 그룹으로 나누어지는 양상을 보였으며(Fig. 4), 이스라엘(EF219380, NC009025)과 미국(EU436455, EU218534)에서 보고된 4개의 염기서열 들은 98~100%의 상동성을 보이고 이 연구에서는 G1으로 분류하였다.

호주(EU436456)와 미국(EU224279, EU224280, EU436423)에서 보고된 다른 4개의 IAPV_RdRP 염기서열은 94~97%의 상동성을 보였고, G2로 분류하였다. 두 그룹간의 RdRP 염기서열은 평균 적으로 약 90% 정도의 상동성만 보여주는 것으로 분석되었다.


```

EF219380 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
NC009025 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU436455 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU218534 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU436456 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU224279 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU224280 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
EU436423 AAACGATACCTGTAATGTGGGTGATACATTGAAAGATGAGCGTCGACCCATTGAAAAAGTAAATCAATTGAAAACACGAGTATCTCAAATGGACCAATGGATTTCTCTATAGCTT
*****

EF219380 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
NC009025 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU436455 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU218534 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU436456 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU224279 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU224280 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
EU436423 TTCGAATGATATTATTTGGGCTTATAGCTCATTTGATGAAAAATCGAATTACTAATGAGGTGTCCATGGAACGAATGTGATTTCTCAAGACTGGAGTAAAACCTGTCGTAAGTTGAC
*****

EF219380 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
NC009025 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU436455 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU218534 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU436456 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU224279 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU224280 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU436423 TAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAGGTGATTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
*****

EF219380 AATAATCTGATCAGACACGATGTTGATGGATGTGTACAATCTGTACACATTTGCAATGACTCCGTGTATATGATGACACACAGCCAAACCCCTCTGGAATCCCGCAACGACTCCGC
NC009025 AATAATCTGATCAGACACGATGTTGATGGATGTGTACAATCTGTACACATTTGCAATGACTCCGTGTATATGATGACACACAGCCAAACCCCTCTGGAATCCCGCAACGACTCCGC
EU436455 AATAATCTGATCAGACACGATGTTGATGGATGTGTACAATCTGTACACATTTGCAATGACTCCGTGTATATGATGACACACAGCCAAACCCCTCTGGAATCCCGCAACGACTCCGC
EU218534 AATAATCTGATCAGACACGATGTTGATGGATGTGTACAATCTGTACACATTTGCAATGACTCCGTGTATATGATGACACACAGCCAAACCCCTCTGGAATCCCGCAACGACTCCGC
EU436456 AACAGTCTGATGATAAGGTTATTGCAAGTGTGTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU224279 AACAGTCTGATGATAAGGTTATTGCAAGTGTGTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU224280 AACAGTCTGATGATAAGGTTATTGCAAGTGTGTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
EU436423 AACAGTCTGATGATAAGGTTATTGCAAGTGTGTTTCAACTTTTGTGATGATCACTGAATGTATGATTTGAAAAAATTTGCAGATTTAGCGAATGAGTTTTATGATGATGAAAAAGAA
*****

EF219380 TCAATGCTTCATTAATAGTATGGATACGAATGTGTTTCGCAATTTGTGTAAGATGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
NC009025 TCAATGCTTCATTAATAGTATGGATACGAATGTGTTTCGCAATTTGTGTAAGATGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU436455 TCAATGCTTCATTAATAGTATGGATACGAATGTGTTTCGCAATTTGTGTAAGATGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU218534 TCAATGCTTCATTAATAGTATGGATACGAATGTGTTTCGCAATTTGTGTAAGATGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU436456 TCAATGCTTCATTAATAGTATGGATACGAATGTGTTTCGCAATTTGTGTAAGATGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU224279 TCAACTGTGTTTATCAATAGTATGGATGCGCAATGTGTTTGCATCTGTGCTAAAGAGGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU224280 TCAACTGTGTTTATCAATAGTATGGATGCGCAATGTGTTTGCATCTGTGCTAAAGAGGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
EU436423 TCAACTGTGTTTATCAATAGTATGGATGCGCAATGTGTTTGCATCTGTGCTAAAGAGGCGAGCATAAAGATGACAATGAGAGATTTTGGTAAGCATGTTCCATGGTCTCTTATGG
*****

EF219380 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
NC009025 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU436455 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU218534 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU436456 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU224279 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU224280 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
EU436423 AGATGACAATGTCATAAATCTCAGTGATGAAGTATGGAATGGTATAACATGGAACACTATGCTAAAGCATTTGAAACCCCTGGATTACCTATACCTGATGAGCTTAAAGGGCGTAAAT
*****

EF219380 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
NC009025 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU436455 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU218534 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU436456 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU224279 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU224280 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
EU436423 GGCGAAGTACCAAAATGGCGATCAATTAAGGACGTCGAGTATTTAAACGTAAGTTTATAGATACGATGAACAACGGAAGGTTTGGGAAGCCCACTTTGATGGACACAATCTTGAAA
*****

EF219380 TGCCAAACTGGTGT
NC009025 TGCCAAACTGGTGT
EU436455 TGCCAAACTGGTGT
EU218534 TGCCAAACTGGTGT
EU436456 TGCCAAATGGTGT
EU224279 TGCCAACTGGTGT
EU224280 TGCCAACTGGTGT
EU436423 TGCCAACTGGTGT
*****

```

Figure 4. Alignment of RdRP sequences of eight different IAPV complete genome. There are 8 different IAPV complete genome that deposited in GeneBank database of NCBI. Four strains (EF219380, NC009025, EU436455, EU218534) presented 100% homogeneity and another strains (EU436456, EU224279, EU224280, EU436423) presented 97% homology, respectively. In between the two groups showed relatively lower homology around 90% on average.

아미노산 서열 분석에서는 8개 중 Group 1에 속하는 3개의 유전자(EF218380, NC009025, EU436455)가 100% 일치하는 상동성을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 5).

```

AAV64179 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
NC009025 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ACD01401 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ABY57949 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ACD01403 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ABY71754 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ABY71756.1 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
ACD01399 KRLPVMWVDTLKDERRP I EKVNLKTRVFSNGPMDFS I AFRMYLGF I AHLMENR I TNEVS I GTNVYSQDWSKTVRKL TKFGNKV I AGDFSTFDGSLNVC I MEKFA DLANEFYDDG
*****

AAV64179 KENNL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CVKNAG I KMTMRDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
NC009025 KENNL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CVKNAG I KMTMRDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ACD01401 KENNL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKNAG I KMTMRDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ABY57949 KENNL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKNAG I KMTMRDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ACD01403 AENSL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKNAG I KMTMRDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ABY71754 AENGL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKEA AVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ABY71756.1 AENGL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKEA AVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
ACD01399 AENGL IRHVLLMDVYNSVHI CNDVSYMMTHSQPSGNPATTPLNCF I NSMGLRMCFA I CAKEA AVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNV I NFDSEVCEWYNNMET I AKAFETLGF TYTDEL
**

AAV64179 KGVNGEVP
NC009025 KGVNGEVP
ACD01401 KGVNGEVP
ABY57949 KGVNGEVP
ACD01403 KGVNGEVP
ABY71754 KGVNGEVP
ABY71756.1 KGVNGEVP
ACD01399 KGVNGEVP
**

```

Figure 5. Alignment of amino acid sequences for RdRP of eight different IAPV. Amino acid sequence of 8 different IAPVs from GeneBank analyzes with Clustal X(Ver.1.83), only used for RdRP regions. This is the results for homology between a.a sequences; which indicates that three IAPV(EF218390, NC009025, EU436455) with lined showed 100% homogeneity compared to others.

위의 두 Fig. 4, 5에서 현재 GeneBank에 등록되어 있는 complete IAPV genome의 RdRP 전장 염기서열에서 약 3 ~ 10% 범위의 변이성을 가지는 것으로 확인되었다.

그에 따라 본 연구에서 검출 및 증폭된 IAPV_RdRP 염기서열의 계통적 분류를 하기 위해 가장 적은 변이성을 보인 pDrive-IAPV_RdRP C6과 위 분석에 사용하였던 NCBI에 등록된 IAPV complete genome을 비교 분석하였다.

Alignment 결과, Clone의 RdRP 염기서열은 Fig. 4에서 분류된 G1군과 상대적으로 높은 98~99%의 상동성을 보였으며, 특히 EU218534에서 제시된 IAPV의 RdRP 염기서열 비교에서 4개의 염기를 제외한 836bp가 일치하였으며, EF219380, NC009205와는 10개의 염기를 제외한 830bp가 일치하여 각 99%와 97.7%의 상동성을 확인하였다. G2에 속하는 다른 IAPV의 RdRP 염기서열과는 평균적으로 91~92%의 상동성을 보여주는 것을 확인하였다(Fig. 6A).

[B]

```

Clones      KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
AAV64179    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
NC009025    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ACD01401    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ABY57949    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ACD01403    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ABY71754    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ABY71756.1 KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
ACD01399    KRLPVMVVDTLKDERRPTEKVNQLKTRVFSNGPMDFSIAFRMYLGFIAHLMENRITNEVSI GTNVYSQDWSKTVRKLTKFGNKV IAGDFSTFDGSLNVCIMEKFAADLANEFYDDG
*****

Clones      KENNLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKNTG I KMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
AAV64179    KENNLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICVKNAGIKMTMRDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
NC009025    KENNLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICVKNAGIKMTMRDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
ACD01401    KENNLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKNAGIKMTMRDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
ABY57949    KENNLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKNAGIKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
ACD01403    AENSLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICARNAGIKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
ABY71754    AENGLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKEAAVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFESLGFTYTDDEL
ABY71756.1 AENGLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKEAAVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
ACD01399    AENGLIRHVLLMDVYNSVHICNDSVYMMTHSQPSGNPAT TPLNCFINSMGLRMCFAICAKEAAVKMTMKDFGKHVSMVSYGDDNVINFSDEVCEWYNMETIAKAFETLGFTYTDDEL
**

Clones      KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
AAV64179    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
NC009025    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ACD01401    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ABY57949    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ACD01403    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ABY71754    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ABY71756.1 KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
ACD01399    KGVNGEVPKWRISKDVQYLKRKFRYDEQRKVWEAPLCMDTILEMPNWC
**

```

Figure 6. Multiple Alignment of DNA sequence and amino acid sequence of RdRP between pDrive-IAPV_RdRP clone 6 and eight different IAPV complete genome

Both DNA sequence and amino acid sequence of pDrive-IAPV_RdRP clone 6 is analyzed by ClustalX(ver 1.83) to calculate the homology presented as a percentage compared to eight different IAPVs from GeneBank. In the sequence of clone 6 has relatively high homogeneity as a 98.5% on average with EU218534, NC009025, EF218380, especially with EU218534. An a.a sequence of RdRP in clone 6 showed the high homogeneity as a 99% with EU436455 and NC_009025 as well whereas it showed relatively lower homogeneity than 90% with another IAPV complete genome sequence from EU436456, EU224279, EU224280, EU436423.

아미노산 서열에서도 염기서열 분석 결과와 같이 EU218534, EF219380, NC009205, EU436455 와 상대적으로 높은 98~99%의 상동성을 보였으며, 특히 EU436455과는 99.2%의 높은 상동성을 갖는 것으로 확인되었다. 그 외의 다른 IAPV complete genome들과 약 90% 이하의 상대적으로 낮은 상동성을 보여준다는 것을 확인하였다(Fig 6B).

Complete genome 염기서열 분석에서 확인된 약 10%의 변이성으로 RdRP 염기서열의 유용 가능성을 제시하기에는 미약하다고 판단하여, 지역에 따른 IAPV의 RdRP 염기서열 변이성을 분석하고자 일본과 중국에서 분리된 RdRP partial sequence들(Table 2.)과 본 논문에서 Reference로 사용했던 Complete genome sequence들의 염기서열과 아미노산 서열을 비교 분석

하였다.

일본과 중국에서 분리된 총 12개의 RdRP partial sequence들간의 염기서열과 아미노산 서열 분석에서 각각 98%의 높은 상동성을 보여주었다(자료 미재시). 하지만, NCBI에 등록된 IAPV complete genome의 RdRP 염기서열과는 아주 낮은 상동성을 보이며, 특이적인 상동성은 확인되지 않았다(Fig. 7)

Table 2. List of RdRP partial cds isolated from Japan and China deposited in GeneBank

Accession No.	Country	Description
AB745499	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 1_iapv
AB745500	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 2_iapv
AB745501	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 3_iapv
AB745502	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 4_iapv
AB745503	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 5_iapv
AB745504	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 6_iapv
AB745505	Japan	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: Japan 7_iapv
AB745494	China	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: China 1_iapv
AB745495	China	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: China 2_iapv
AB745496	China	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: China 3_iapv
AB745497	China	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: China 4_iapv
AB745498	China	IAPV for RdRP, partial CDs, isolated: China 5_iapv

```

AB745494_Cb1 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745497_Cb4 -----TATGTATGGACACAATCTTGAGATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745496_Cb3 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745498_Cb5 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745495_Cb2 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745501_Ja3 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745502_Ja4 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745505_Ja7 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745499_Ja1 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745503_Ja5 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745500_Ja2 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
AB745504_Ja6 -----TATGTATGGACACAATCTTGAAATGCCAAACTGGTGTGCGAGGAGGACTT
NC009025 CGAATGTATTATTGGGCTTATAGCTCAITTGATGAAAATCGAATTACTAATGAGGTGCCAATGGAACGAATGTGTTCTCAAGACTGGAGTAAACTGTTCGT
* * * * *
AB745494_Cb1 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745497_Cb4 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745496_Cb3 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745498_Cb5 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745495_Cb2 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745501_Ja3 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745502_Ja4 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745505_Ja7 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745499_Ja1 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745503_Ja5 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745500_Ja2 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
AB745504_Ja6 GACATTCGAAGAAGGTACAAGATTGAATTGAAAAATGCAATTTATGGAGCTTCCATGCATGAA-GAGAGCGTTTTCAATACCTGGTCT-AAAAATAATTGACCGAGC
NC009025 AA-GTTGACTAAATTTGGAATAAAGTTATTGCAG-GTGATTTTCAACTTTTGTATGGATCAGTAAGTATGTATTGAAAAAATTCGACATTTAGCGAATGAGT
* * * * *
AB745494_Cb1 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745497_Cb4 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745496_Cb3 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745498_Cb5 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745495_Cb2 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745501_Ja3 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745502_Ja4 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745505_Ja7 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGACATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745499_Ja1 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGATATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745503_Ja5 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGATATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745500_Ja2 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGATATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
AB745504_Ja6 AT-ATGCAATGGCACTGGAGATCACCTGGATATAAACAC-TTATCG-TGGTTATGCTCAGGAGCG-ATTTCTGGAAT-ACTATATGTAG-----
NC009025 TTTATGATGATGAAAAAATAAATCTGATCAGACACGTAITGTTGATGGATGTACAAITCTGTACACATTTGCAATGACTCCGTTATATGATGACAC
* * * * *

```

Figure 7. Multiple Alignment between the RdRP partial sequence from Japan& China and full length of RdRP sequence from IAPV complete genome

Analysis for the comparison with 12 different RdRP partial sequences isolated from Japan and China by Clustal X program showed about 98% homology whereas the comparison of partial sequences with full length of RdRP of IAPV complete genome showed the low homology with less than 20%. Which indicates that it does not show a significant homogeneity between RdRP partial sequence isolated from Japan/China and RdRP sequence of IAPV complete genome identified in different area, USA, Israel.

위의 염기서열 분석 결과에 따라 본 연구에 사용된 풀벌 시료에서 증폭된 RdRP 염기서열은 결과적으로 기존에 NCBI에 등록되었던 IAPV complete genome 중 EU218534(USA)과 비교하여 염기 서열과 아미노산 서열에서 각각 99%와 98%의 높은 상동성을 갖는 것으로 확인되었고, 이는 본 연구에서 제작된 pDrive-IAPV_RdRP가 그 계통에서 유래된 IAPV로 분류된다고 사료되어진다. EU218534(USA)와 높은 상동성을 가졌던 EU218380과 NC009025와의 염기서열과 아미노산 서열 비교 분석에서 각 97%와 98%의 높은 상동성을 보여주었으므로, 이 4개의 RdRP 가 같은 계통학적 형질을 가지며, 분류된다는 것을 확인할 수 있었다.

또한 GeneBank에 있는 8개의 IAPV complete genome들을 모두 비교할 시 염기서열상 약 85% 이상의 상동성을 보였고, 단백질 수준에서의 변이가 염기 서열의 변이에 비하여 낮은 결과를 보여주었지만, 염기서열상의 낮지 않은 변이성이 RdRP 염기서열 분석이 IAPV의 계통

분류에 유용하게 사용될 수 있을 것이라는 가능성을 제시한다.

흥미롭게도, 일본과 중국에서 분리되어 보고된 모두 12개의 RdRP partial sequence들은 그들 간에는 아주 높은 상동성을 보였지만, IAPV complete genome과는 염기서열과 아미노산 비교에서 모두 약 20% 이하의 낮은 상동성을 갖는 것으로 보여주었고, 이것은 전혀 상동적이지 않다는 것을 의미하고 있다(Fig. 7). 이것은 다른 염기 서열 분석 결과들에 더하여 RdRP 염기서열의 변이성이 있다는 것을 뒷받침해주는 결과이며, RdRP 염기서열에 따른 지역적인 IAPV의 분류적 가능성도 제시하는 바이다.

라. 적 요

꿀벌에 감염을 일으키는 Israeli Acute Paralysis Virus(IAPV)가 Metagenome 분석을 통해 봉군붕괴현상(CCD; colony collapse disorder)의 가장 유력한 주요 원인 바이러스라고 보고되었다. IAPV와 KBV의 완전한 genome 염기서열이 밝혀지고 그 분석으로 IAPV는 변이성이 높은 RNA 주형의 바이러스라고 알려졌다. non-structural 단백질의 한 부분인, RNA dependent RNA Polymerase(RdRP)은 바이러스의 RNA 주형을 기반으로 상보적인 RNA 가닥의 합성을 촉진시키는 효소이며, DNA stage를 가지지 않는 모든 RNA 바이러스의 genome을 암호화하는데 필수적인 단백질이다.

RdRP 염기서열의 변이성이 나타나는지 분석하고, 계통학적 분류를 위한 유용 가능성을 연구하기 위해 본 연구에서는 특이적 프라이머를 제작, RdRP 유전자를 증폭하고 클로닝을 수행하여 pDrive-IAPV_RdRP clones을 제작하였으며, 염기서열 분석에 사용하였다. pDrive-IAPV_RdRP clone들은 GeneBank database에 등록된 IAPV(Access. no. EU218534 and NC009025)의 RdRP 염기서열과 아미노산 서열에서 각각 97%와 99%의 상동성을 보인 반면 다른 IAPV complete genome들과는 약 90% 정도의 상대적으로 낮은 상동성을 보여줬다.

IAPV complete genome의 RdRP 염기서열 분석에서 약 10%의 변이성을 확인하였고, 또한 일본 및 중국에서 분리된 RdRP partial 서열과 IAPV의 RdRP 서열간의 분석 결과를 통해 RdRP의 유전자 염기서열과 단백질 서열 모두에서 변이성을 가진다는 것이 확인할 수 있었다. 본 연구에서 수행된 결과들은 RdRP 염기서열 분석이 일반적인 IAPV의 계통학적 분류에 사용할 수 있으며, 또한 지역에 따른 IAPV의 계통적 분류에 대한 가능성을 제시하고 있다.

4. Israel acute paralysis virus (IAPV)의 항원을 위한 재조합 Capsid protein의 생산

가. 서론.

본 연구는 Israel acute paralysis virus(IAPV) 특이 단백질 항원의 대량 생산을 목적으로, IAPV의 Capsid protein 유전자를 대장균에서 재조합 발현시키고, 정제한 것이다.

본 연구는 Journal of Apiculture (2011), 26(3)에 “Capsid protein gene expression of Israel acute paralysis virus in honeybee (*Apis mellifera* L.)” 의 제목으로 발표되었기에, 본 보고에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

나. 재료 및 방법

(1) IAPV Capsid protein의 molecular cloning을 위한 primer들 및 그 염기서열

Table 1. Primer sequence for IAPV molecular cloning.

Name	Sequence(5'→3')	Product size	Reference
IAPV-VP2-F	ATGATTGGGGCGGTGTAATA	548bp	This study
IAPV-VP2-R	TACGTCTTCTGCCCATTTCC		

(2) IAPV Capsid protein의 subcloning을 위한 primer들 및 그 염기서열

Table 2. Primer sequence for subcloning including to restriction site

Name	Sequence(5'→3')	Product size	Reference
IAPV-VP2-B	<u>GGATTC</u> GATGATTGGGGTGGAGTTATA	561bp	This study
IAPV-VP2-S	GTCGACT <u>ACGTCTTCTGCCCATTTCC</u>		

*Two sites as underlined indicate BamHI/Sal I restriction enzyme site, respectively.

다. 결과 및 고찰

(1) IAPV Capsid protein gene의 염기서열

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1 atgattggggtggagttataaccagtgggaatgccttggtattctaaatccattagaactacaagtatttcagaaacggaaaatcgtgaaactgaagtcac 100
|||||||||##|##|##| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
1 ATGATTGGGGCGGTGTAATACCAGTGGGAATGCCTTGTTATTCTAAATCCATTAGAACTACAAGTATTTTCAGAAACGGAAAATCGTGAAACTGAAGTCAT 100
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101 agatgccgctccatgtgaatatgttgctaacatggttctcgactggcgtgcaactatgtgttataggattaccggtggtgaagacagcttttcatactggc 200
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||#| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
101 AGATGCCGCTCCATGTGAATATGTTGCTAACATGTTCTCGTATTGGCGTGCAACTATGTGTTATAGGATTACCGTGGTGAAGACAGCTTTTTCATACTGGC 200
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201 agacttgagattttcttgaaccaggagtatacccgctcaaacccactgttaataacattgggcccgatcaggatcaactcacaggagtggtgctcctt 300
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||##| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||#| |||||||||||
201 AGACTTGAGATTTTCTTTGAACCAGGAGTGATACCCGCTCAAACCCACTGCAAATAACATTGGGCCCGATCAGGATCAACTCACAGGAGCGGTGGCTCCTT 300
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301 ccgataaataactataagtacattttggacctgactaatgatacagaagttacaatacgtgttccttttgtttcaaataagatgttccttaagactgctgg 400
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
301 CCGATAAATAACTATAAGTACATTTTGGACCTGACTAATGATACAGAAGTTACAATAACGTTTCCTTTTGTTCAAATAAGATGTTCCCTTAAGACTGCTGG 400
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401 aatctatggtgctaatagtgaaaataactggaactttcatgaatcctttagtggattcttgtgtataagaccagtcactaaattgatggtccttgatact 500
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||#| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
401 AATCTATGGTCTAATAGTGAATAACTGGAACCTTTCATGAATCCTTTACTGGATTCTTGTGTATAAGACCAGTCACTAAATTGATGGCTCCTGATACT 500
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

      *      *      *      *
501 ggtctgacaatgtatctatagttggttggagtgycagaagatgta 548
||||||||||||||||||||||||||#| |||||##| |||
501 GTGTCTGACAAATGTATCTATAGTTGTTGGAAATGGGCAGAAGACGTA 548
      *      *      *      *

```

Figure 1. Alignment between IAPV gene in this study and EU436509 from GenBank nucleotide sequences in this study revealed 10 mismatches. Among these mismatches, three of them caused amino acid replacement.

(2) 단백질 발현에 사용된 IAPV Capsid protein gene의 염기서열

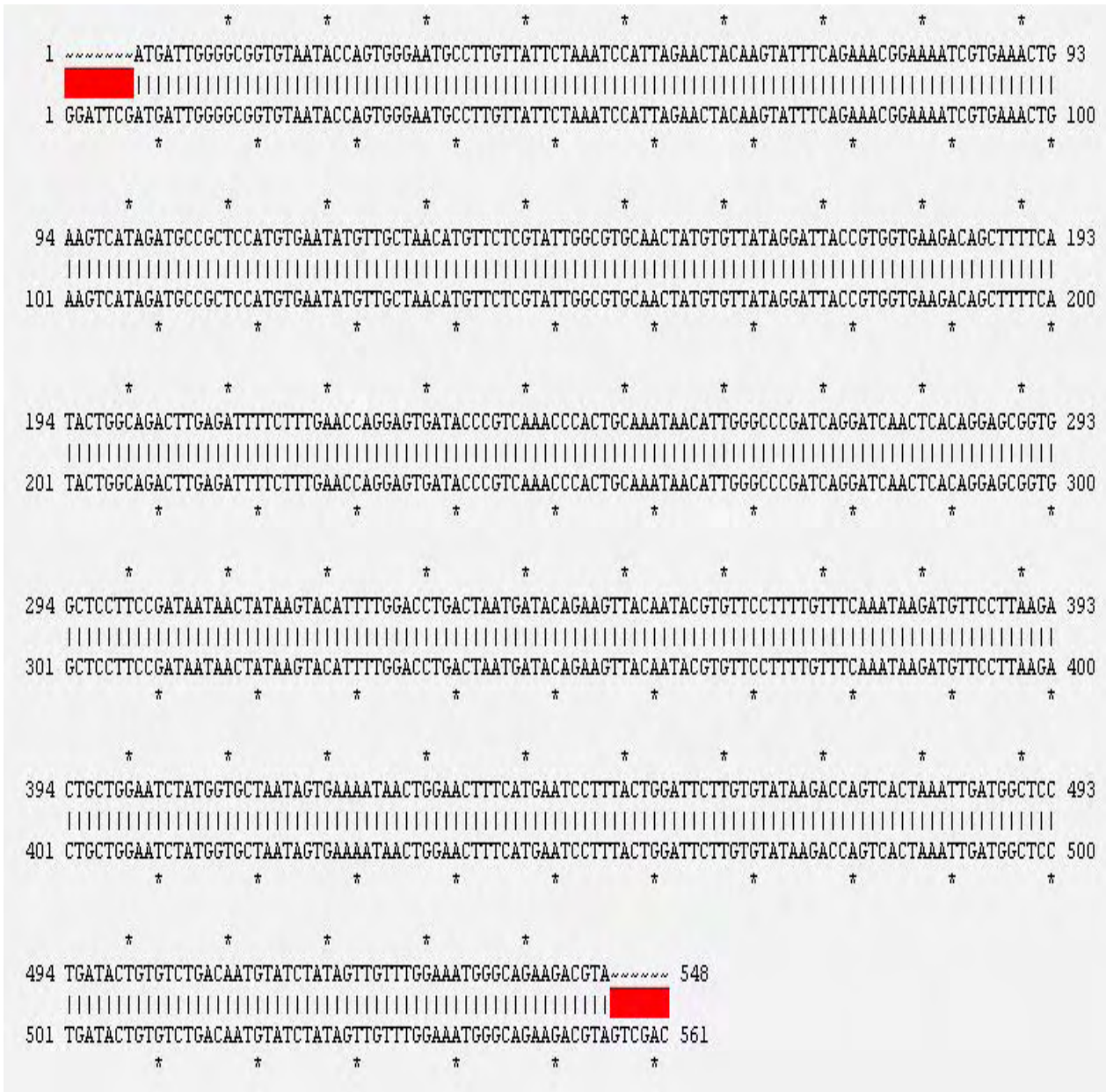


Figure 2. Alignment between IAPV gene in molecular cloned and sub-cloned. Sub-cloned IAPV sequence was added BamH I /Sal I restriction enzyme site.

(3) 재조합 IAPV Capsid protein gene의 단백질 발현

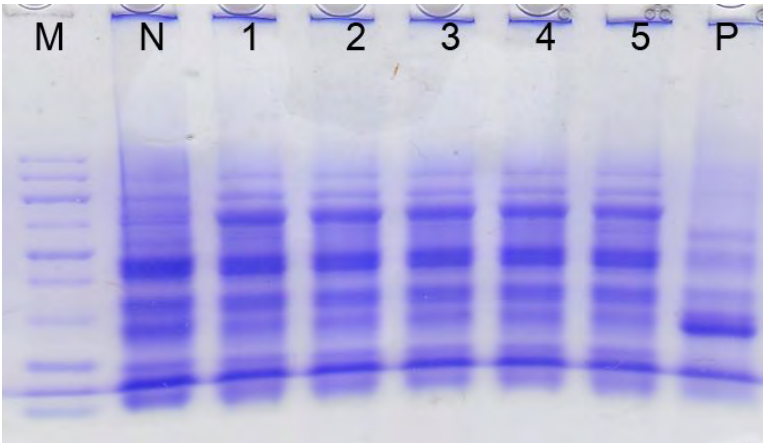


Figure 3. Expression of IAPV depends on IPTG concentration

pQE30-IAPV in M15 was cultured until OD600=0.6 and induced by IPTG to express recombinant IAPV. Inducted cell was collected after 5 hrs. Lane M is protein size marker (Fermentas, USA; 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5kDa). Lane N is negative control as no induction. Lanes 1 to 5 are 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 and 1.0mM IPTG concentration, respectively. Lane P is positive control as gfp expression.

(4) 재조합 IAPV Capsid protein gene의 최적 발현 조건

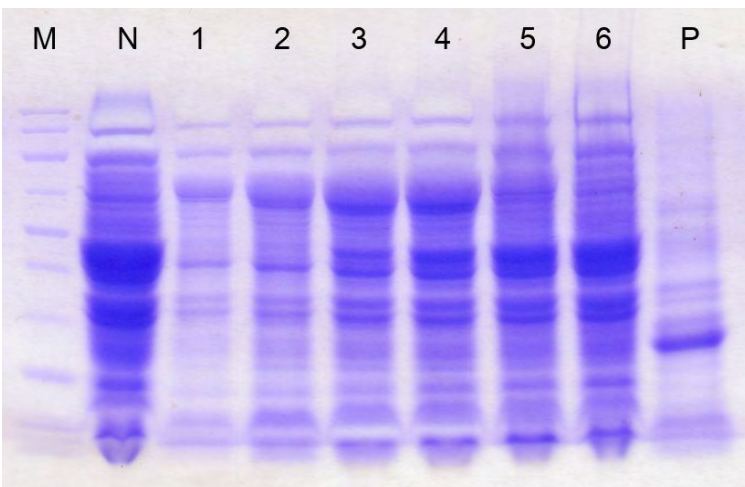


Figure 4. Optimal induction point for expression of recombinant IAPV

pQE30-IAPV in M15 was started to induce 0.1mM at variable OD600 concentration. Inducted cell was collected after 5 hrs. Lane M is protein size marker (Fermentas, USA; 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5kDa). Lane N is negative control as no induction. Lanes 1 to 6 are induction at OD600=0.2, 0.35, 0.5, 0.7, 0.9 and 1.25, respectively. Lane P is positive control as gfp expression.

(5) 재조합 IAPV Capsid protein gene의 최적 발현 시간

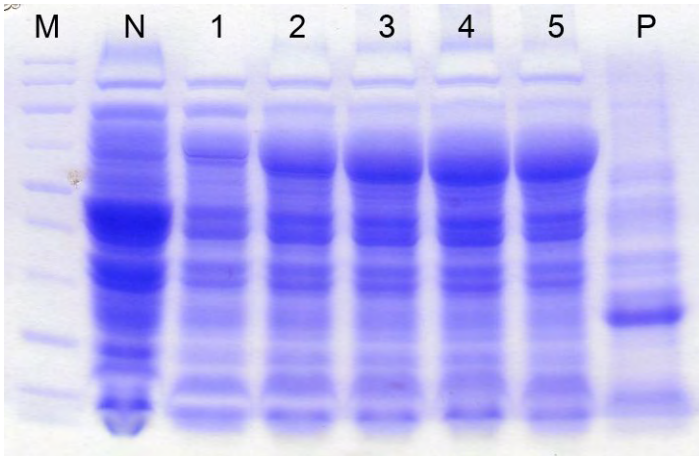


Figure 5. Optimal incubation time recombinant IAPV

pQE30-IAPV in M15 was started to induce 0.1mM at OD600=0.7 and collected cells at different induced time. Lane M is protein size marker (Fermentas, USA; 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5kDa). Lane N is negative control as no induction. Lanes 1 to 6 are collected cells after 1, 3, 5, 7 and 10hrs long induction, respectively. Lane P is positive control as gfp expression.

(6) Inclusion body의 형성에 의한 재조합 IAPV Capsid protein의 발현

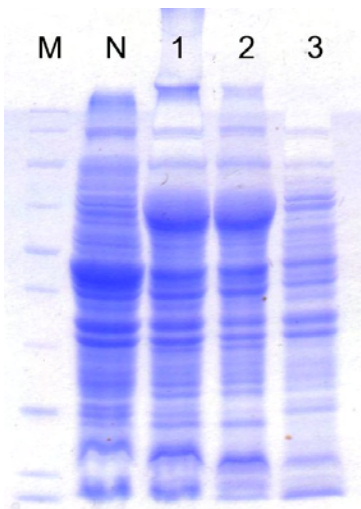


Figure 6. Formation of inclusion body

After sonication, location of IAPV protein was checked either the supernatant and pellet in divided total protein by centrifugation. Lane M is protein size marker (Fermentas, USA; 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 and 5kDa). Lane N is negative control as no induction. Lane 1 is total protein. Lane 2 is supernatant and lane 3 is pellet. Target protein located in pellet of total protein.

제 10 절 Kakugo virus의 검색과 신규 검출법의 개발

1. Kakugo virus의 국내 존재의 규명 가. 서론.

본 연구는 국외에서만 보고되었던 꿀벌의 병원체인 Kakugo virus가 국내에도 존재함을 처음 밝힌 것으로, 이후 국내의 Kakugo virus에 대한 연구의 시발점이 되었다.

본 내용은 Journal of Apiculture (2012), 27(1)에 발표된 것으로, 본 보고에서는 그 결과를 중심으로 발췌하여 전재한다.

나. 결과 및 고찰.

(1) 검출에 사용된 primer 및 그 염기서열

Table 1. primers of Kakugo virus for cloning and detection.

Oligo name	Sequence (5' → 3')	mer	product size	Reference
Kakugo-F	GGA TCC ATG CGT CCC GAA CTT GAG	24	1104 bp	this study
Kakugo-R	GTC GAC CGC GCT AGC ATA ACA TCT AAC	27		

(2) Kakugo virus의 유전자 확보를 위한 molecular cloning

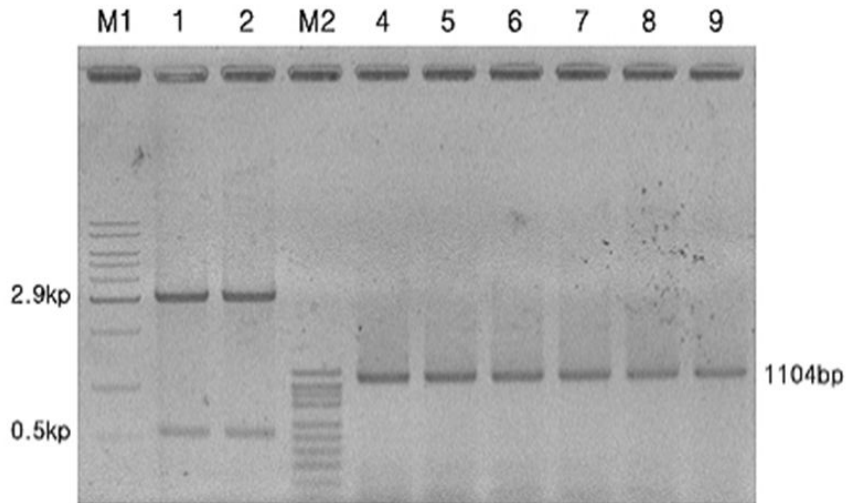


Fig. 1. Identification of pBX vector restriction. And the PCR detection of KV in honey bees collected from Korean apiary.

(3) Kakugo virus의 염기서열 및 비교 분석

```

Query 76  ACTATATTCACGGATTGTTTGAAAGATACTTGTTTGCCTGTGGAAAAATGTAGAATACCT 135
      |||
Sbjct 1   ACTATATTCACGGATTGTTTGAAAGATACTTGTTTGCCTGTGGAAAAATGTAGAATACCT 60

Query 136 GGTAAGACTAGAATATTTAGTATAAGTCCGGTACAGTTTACTATAACCGTTTACAGAT 195
      |||
Sbjct 61  GGTAAGACTAGAATATTTAGTATAAGTCCAGTACAGTTTACTATAACCGTTTACAGAT 120

Query 196  TACTTAGATTTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCACGACTTAATGCTGAGCATGGTATTGGT 255
      |||
Sbjct 121 TACTTAGATTTTTATGGCATCCTATCGAGCTGCACGCCCTAACGCTGAGCATGGTATAGGT 180

Query 256  ATTGATGTTAACAGCTTAGAATGGACAAATTTGGCAACAAGTCTGTCAAAGTATGGCACT 315
      |||
Sbjct 181  ATTGATGTTAACAGCTTAGAATGGACAAATTTGGCAACAAGTCTGTCAAAGTATGGCACT 240

Query 316  CATATCGTGACGGGTGACCATAAGAATTTGGCCCTGGCTTAGATTCCGATGTTGCAGCT 375
      |||
Sbjct 241  CATATCGTGACGGGTGACTATAAGAATTTGGCCCTGGATTAGATTCCGATGTTGCAGCT 300

Query 376  TCGGCGTTCGAAATTATATCGACTGGGTATTACATTATACTGAAGAAGATAATAAAGAC 435
      |||
Sbjct 301  TCGGCGTTCGAAATTATATCGACTGGGTATTACATTATACTGAAGAAGATAATAAAGAC 360

Query 436  GAAATGAAGCGAGTAAATGTGGACCATGGCGCAAGAGATTTTAGCGCCTAGTCATCTATGT 495
      |||
Sbjct 361  GAAATGAAGCGAGTAAATGTGGACCATGGCGCAAGAGATTTTAGCGCCTAGTCATCTATGT 420

Query 496  CGCGATTTGGTATACCGAGTACCTTGTGGAATTCATCAGGTTCTCCAATAACGGACATA 555
      |||
Sbjct 421  CGTGATTTAGTGTACCGAGTACCTTGTGGAATTCATCAGGCTCTCCGATAACGGACATT 480

Query 556  TTGAACACAATTTCAAATTGTTTGTTAATTAGGTTAGCTTGGTTAGGTATTACTGACTTG 615
      |||
Sbjct 481  TTAAATACAATTTCAAATTGTCIGTTAATTAGGTTAGCTTGGTTAGGTATTACTGATTG 540

Query 616  CCTTTGTCGAGTTCCTCTCAAATGTTGTTCTTGTGTTTGTATGGTGATGATCTTATCATG 675
      |||
Sbjct 541  CCTTTATCCGAGTTCCTCTCAAATGTTGTTCTTGTGTTTGTATGGTGATGATCTTATCATG 600

Query 676  AATGTTAGTGATAACATGATTGATAAATTTAATGCTGTGACAATAGGAAAATTCFTTCA 735
      |||
Sbjct 601  AATGTTAGTGATAACATGATTGATAAATTTAATGCTGTGACAATAGGAAAATTCFTTTCG 660

Query 736  CAATATAAGATGGAATTTACGGATCAAGATAAGTCACGAAATACTGTGAAGTGGCGGACG 795
      |||
Sbjct 661  CAATATAAGATGGAATTTACGGATCAGGACAAATCAGGAAATACTGTGAAGTGGCGGACG 720

Query 796  TTACAGACTGCTACTTTCTTAAAACATGGGTTTTTAAAACATCCAACCTAGACCTGTGTTT 855
      |||
Sbjct 721  TTACAGACTGCTACTTTCTTGAAGCATGGGTTTTTAAAACATCCAACCTAGACCTGTGTTT 780

Query 856  CTGGCTAACCTAGACAAG-TTTCGGTAGAAAGAACGACGAATTGTACCCATGCTCGAGGA 914
      |||
Sbjct 781  CTGGCTAACCTAGACAAGGTTTTCGGTAGAAGGAACGACGAATTGGACCCATGCTCGAGGA 840

Query 915  TTGGGTCGTCGCGCAGCAACCATAGAGAATGCTAAACAAGCGCTAGAGTTA 965
      |||
Sbjct 841  TTGGGTCGTCGTCGCAACCATAGAGAATGCTAAACAAGCGCTAGAGTTA 891

```

Fig. 2. DNA sequence homology between AB250362.1 and Korean KV strain. This query indicates nucleotides from KV Korean strains in this study. The determined sequence corresponds to nucleotides in 1-891 of AB250362.1 (Kakugo virus gene for polyprotein, RNA dependent RNA polymerase region, partial cds, strain: BF7-050602 in the GenBank database). Identical residues are indicated in the consensus line with a vertical bar (|). The nucleotide sequence was aligned to AB250362.1, which revealed 96.6% homology.

(4) Kakugo virus의 유전자에 기반한 아미노산 서열 및 비교 분석

```

Query 1 TIFTDCLKDTCCLPVEKCRIPGKTRIFSFISPVQFTIPFRQYYLDFMASYRAARLNAEHGIG 60
Sbjct 1 TIFTDCLKDTCCLPVEKCRIPGKTRIFSFISPVQFTIPFRQYYLDFMASYRAARLNAEHGIG 60

Query 61 IDVNSLEWTLNLSLSKYGTHIVTGDHKNFGPGLSDVAASAFEIIIDWVLHYTEEDNKD 120
Sbjct 61 IDVNSLEWTLNLSLSKYGTHIVTGD+KNFGPGLSDVAASAFEIIIDWVLHYTEEDNKD 120

Query 121 EMKRVMWTMAQEILAPSHLCRDLVYRVPCGIPSGSPITDILNTISNCLLIRLAWLGITDL 180
Sbjct 121 EMKRVMWTMAQEILAPSHLCRDLVYRVPCGIPSGSPITDILNTISNCLLIRLAWLGITDL 180

Query 181 PLSEFSQNVVVLVCYGDDLIMNVSNDMIDKFNAVITIGKFFSQYKMEFTDQDKSGNTVKWRT 240
Sbjct 181 PLSEFSQNVVVLVCYGDDLIMNVSNDMIDKFNAVITIGKFFSQYKMEFTDQDKSGNTVKWRT 240

Query 241 LQTATFLKHGFLKHPTRPVFLANLDKVSVEGTTNCTHARGLGRRRAATIENAKQALEL 297
Sbjct 241 LQTATFLKHGFLKHPTRPVFLANLDKVSVEGTTNCTHARGLGRRRAATIENAKQALEL 297

```

Fig. 3. Amino acid sequence homology between AB250362.1 (protein No. BAF32580) and Korean KV strain. This query indicates nucleotides from Korean KV strains in this study. The determined DNA sequence in this study was translated into amino acid sequences and compared with 1-297 amino acid sequences of BAF32580.1 (polyprotein of Kakugo virus). Identical residues are indicated in the consensus line with alphabets. The amino acid sequence was aligned to BAF32580.1, which revealed 99.3% homology.

2. Loop-mediated isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발

가. 서론

곤충에 의한 수분매개는 전체 농작물 중 3분의 1을 차지하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 80%가 꿀벌(*Apis mellifera* L.)에 의해 이루어 질 정도로 꿀벌은 매우 중요한 수분 매개자 이다(Klein *et al.*, 2007). 꿀벌이 생산하는 프로폴리스, 꿀벌, 화분, 봉독 등은 각종 기능성 식품, 화장품, 치료제 등의 생산에도 크게 기여하고 있어(Morse and Calderone, 2000; Klein *et al.*, 2007) 산업동물로서 꿀벌의 중요성은 날로 커져가고 있다.

한편, 바이러스로 인한 꿀벌의 질병은 18종 이상이 알려져 있으나(Allen and Ball, 1996), 현재 까지도 바이러스성 질병에 대한 적절한 치료법은 제시된 바 없으며, 강균양성 및 유지만이 자연치료를 이끌 수 있는 유일한 예방책으로 알려져 있다. 현재까지 꿀벌에 질병을 일으키는 바이러스들은 Deformed wing virus(DWV), Acute bee paralysis virus(ABPV), Chronic bee

paralysis virus(CBPV), Black queen cell virus(BQCV), Kashmir Bee virus(KBV), Sacbrood virus(SBV), Israeli acute paralysis virus(IAPV), Apis iridescent virus, Cloudy wing virus(CWV) 등 18종 이상이 밝혀져 있다(Ghosh et al., 1999; Govan et al., 2000; Leat et al., 2000; de Miranda et al., 2004; Lanzi et al., 2006; Maori et al., 2007). 특히 이들 꿀벌 바이러스들은 봉군을 지속적으로 약화시켜 다른 병인체와 혼합감염을 일으키며, 이러한 혼합감염은 봉군의 붕괴 등 봉군 전체에 치명적 손상을 일으키기에 최근 그 문제점이 심각하게 대두되고 있다(유 등, 2008).

Kakugo Virus(KV)는 2004년 일본에서 처음으로 발표되었다(Fujiyuki *et al.*, 2004). KV는 외관상으로는 건강하지만 공격적인 성향을 나타내는 일벌의 뇌에서 분리된 picorna virus계열의 virus이며(Fujiyuki *et al.*, 2005), KV의 RNA는 2,893개의 아미노산을 암호화한다. 이 아미노산들은 picorna virus와 비슷한 polyprotein들과 구조적 특징과 염기서열의 유사성을 공유한다(Fujiyuki *et al.*, 2004).

또한, KV는 뇌를 감염시킬 뿐만 아니라 하인두샘과 지방체들을 감염시킨다. KV의 감염은 일벌에서 체계적으로 나타난다(Fujiyuki *et al.*, 2004). 체지방은 곤충의 물질대사와 면역, 페로몬 생산에 중요하며(Krupp *et al.*, 2008), KV의 감염은 일벌의 생리학적 상태와 페로몬 생산에 영향을 줄 것으로 사료된다(Fujiyuki *et al.*, 2009). 한국에서는 Boram Lee 등(2012)에 의하여 처음으로 Kakugo Virus의 존재를 확인하였다.

한편 Notomi 등(2000)은 strand displacement activity가 높은 *Bst* DNA polymerase를 이용하여 등온에서 특정 유전자를 loop 구조로 증폭시키는 Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)법을 고안하였다. 일반 PCR이 2개의 primer를 사용하는 것과 달리, LAMP는 6개의 유전자 위치를 인식하는 4개의 primer를 사용하게 된다(Blomstrom *et al.*, 2008; Nagamine *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). 이는 LAMP가 target DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미한다(Tsugunori, 2007).

LAMP의 가장 큰 특징은 등온에서 유전자의 증폭이 이루어진다는 점이다. 이는 온도의 구배가 필요한 PCR에 비해서 등온 조건은 몇 가지 이점을 가지고 있다. 먼저 온도 조절이 필요 없기 때문에 상대적으로 반응 시간이 짧아진다. 따라서 좀 더 빠른 시간 내에 유전자 증폭을 가능하게 한다. LAMP를 이용한다면 전기영동 시간을 제외하고 한 시간 내에 유전자 증폭이 가능함을 기존 여러 논문에서 이미 보고된 바 있다(Ohori *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). 또한 등

은 조건에서의 증폭은 LAMP가 다른 검출 방법들과 달리 현장성을 가질 수 있다는 근거가 된다(Yoshiteru *et al.*, 2006). 일정한 온도만 유지하면 반응을 일으킬 수 있기 때문에 고가의 장비가 필요 없이 항온수조 등 간단한 장비만을 가지고도 반응이 가능하다. 따라서 LAMP를 이용한다면 굳이 실험실 내에서의 환경이 아니더라도 양봉현장에서 특정 유전자의 검출이 가능해진다.

한편, 우리나라에서는 LAMP법으로 KV를 진단할 수 있는 방법이 이종구 등(2012)에 의하여 제시된 바가 있다. 하지만 본 연구에서는 기존의 최적조건에 같은 민감도를 가지면서 더 빠른 시간내에 KV를 검출할 수 있는 진단법을 개발하고자 하였다.

나.재료 및 방법

(1) Kakugo Virus Clone 준비

본 연구에서는 Kakugo Virus sequence(GenBank No. AB250362.1)의 97%의 상동성을 보이는 sequence와 pBX T vector를 포함하는 pBX-KV clone(Boram Lee *et al.*, 2012)을 사용하였다. pBX-KV clone은 최적조건 확인, 민감도 확인 등의 실험에 LAMP 주형으로 사용되었다.

(2) KV-LAMP(s)법의 primer 설계 및 제작

LAMP primer designing software인 PrimerExplorer V4(<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)를 이용하여 KV 특이 LAMP용 primer를 제작하였다. KV-LAMP(s)에 사용할 primer set는 Table 1.에 나타내었다. Forward inner primer인 KV-FIP(2)는 KV antisense sequence의 상보적인 염기서열(F2)과 TTTT linker 그리고 loop를 형성하는 염기서열(F1c) 부분을 결합한 것으로 52nt의 long-nucleotide로 제작하였다.

Reverse inner primer인 KB-BIP(2)는 KV sense sequence의 상보적인 염기서열(B2)과 TTTT linker, loop를 형성하는 염기서열(B1c) 부분을 결합한 것으로 각각 52 nucleotides로 제작하였다. 또한 outer primer KV-F3(2)과 KV-B3(2)는 inner primer들의 바깥쪽에 위치하도록 설계하였으며 각각 18, 19nt의 크기로 제작하였으며 inner primer들의 경우에는 PAGE 정제 후 사용하였다(Fig 1).

Table 1. Information of KV-LAMP(s) primer set

Oligo	Sequence(5'→3')	Length (mer)
KV-F3(2)	TTAACGCTGAGCATGGTA	18
KV-B3(2)	ACTCGCTTCATTTTCGTCTT	19
KB-FIP(2) ¹⁾	TGAGTGCCATACTTTGACAACTTTTTTATTGATGTTAACAGCT TAGAATGG	52
KB-BIP(2) ¹⁾	TAAGAATTTTGGCCCTGGATTAGATTTTTAGTATAATGTAATAC CCAGTCGA	52

¹⁾FIP : combine by F1c and F2

²⁾BIP : combine by B1c and B2

5'-GCCTTAACGCTGAGCATGGTATAGGTATTGATGTTAACAGCTTAGAA
KV-F3(2) KV-F2(2)(sense)
TGGACAAATTTGGCAACAAGTTTGTCAAAGTATGGCACTCATATCGTGA
KV-F1(2)(loop)
CGGGTGACTATAAGAATTTTGGCCCTGGATTAGATTCCGATGTTGCAGC
KV-B1(2)(loop)
TTCGGCGTTCGAAATTATTATCGACTGGGTATTACATTATACTGAAGA
KV-B2(2)(anti-sense)
AGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGT-3'
KV-B3(2)

Figure 1. Nucleotide sequences and location of primers for KV-LAMP(s).

(3) KV-LAMP(s)의 최적 반응온도 측정

KV 검출을 위한 primer set의 활성 최적 온도를 측정하였다. 반응액은 주형인 pBX-KV plasmid (Boram Lee *et al.*, 2012) 1ng, KV-FIP(2)/BIP(2)는 각각 40pmole, KV-F3(2)/B3(2)는 각각 10pmole, 2.5mM dNTP, 10× reaction buffer, 8U *Bst* DNA polymerase(NEB, U.S.A), DMSO(최종농도 5%)를 첨가하여 총 20μl로 조성하였다. *Bst* DNA polymerase는 80℃ 이상이 되면 불활성화 되는 특징을 가지고 있어, 94℃에서 5분간 DNA를 해리시킨 뒤 즉시 ice로 옮겨 온도를 낮추고 1분 정치 후에 첨가하였으며, 이 후 60분간 DNA 신장을 진행하였고 80℃에서 10분간 정치해 *Bst* DNA polymerase를 불활성화 시킨 후 종료하였다. DNA 신장의 최적온도

측정은 50.0~65.0℃ 구간에서 1시간 동안 등온조건하에서 진행하였으며, 각 LAMP반응이 끝난 후 전기영동으로 확인하여 KV-LAMP(s)에 대한 최적온도를 측정하였다.

(4) KV-LAMP(s)의 최적 반응액 조성

또한 KV-LAMP(s)의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer set과 dNTP의 농도를 달리 하여 반응액 조성에 따른 최적 조건을 확인하였다. primer의 농도는 Notomi 등(2000)이 제시한 outer primer와 inner primer의 농도가 1:4일때 가장 높은 효율을 보였다는 결과를 바탕으로 이 비율을 유지하되 primer의 절대농도만을 변화시켜 그 결과를 측정하였다. 즉, inner primer의 각 농도가 20pmole, 40pmole, 60pmole, 80pmole, 100pmole일때 outer primer의 각 농도는 5pmole, 10pmole, 15pmole, 20pmole, 25pmole로 하여 LAMP를 수행하였다. dNTP의 경우 각각 1.25mM, 2.5mM, 5mM, 7.5mM, 10mM이 되도록 조성하여 측정함으로써 최적 반응 조건을 확립하였다.

(5) KV-LAMP(s)에서 primer의 검출한계

KV-LAMP(s)의 검출한계를 측정하기 위하여 pBX-KV plasmid의 copy수를 아래의 식에 따라 계산하여 1×10^7 copies부터 1/10씩 단계희석한 후, 이를 주형으로 하여 확립된 최적조건에서 LAMP를 수행하였다.

$$\frac{6 \times 10^{23}(\text{copies/mol}) \times \text{concentration}(\text{g}/\mu\ell)}{MW(\text{g/mol})} \\ = \text{amount}(\text{copies}/\mu\ell)$$

(6) KV-LAMP(s)의 최소 반응 시간 확인

KV-LAMP(s)의 최소 반응 시간을 확인하기 위하여 KV 검출에 필요한 최소 반응 시간을 확인하고자 하였다. 94℃에서 5분간 반응시킨 후, *Bst* DNA polymerase를 첨가한 반응액의 polymerization 시간을 60분, 50분, 40분, 30분, 20분, 10분으로 조절하여 그 증폭 정도를 비교하였으며, LAMP반응은 KV-LAMP(s)의 확립된 표준조건으로 수행하였다.

(7) Fluorescent Dye test

KV-LAMP(s) 종료 후 전기영동의 수행 없이 확인하기 위하여, DNA 이중 가닥에 삽입되어

녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye(Baygene Biotech Company Limited, China)를 사용하였다. SYBR Green I을 사용한 반응액은 ultraviolet transilluminator상에서 관찰하였으며, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용한 반응액은 형광등을 광원으로 하여 관찰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) KV-LAMP(s) 최적 반응 온도 및 반응액 조성

LAMP 반응의 최적 반응 조건을 측정하기 위하여 pBX-KV plasmid DNA를 주형 DNA로 사용하였다. 최적 반응 온도를 측정하기 위하여, 50.0℃, 51.3℃, 52.5℃, 54.2℃, 56.4℃, 58.9℃, 61.0℃, 63.9℃, 65.0℃에서 1시간 동안 각기 등온조건하에서 KV-LAMP(s)를 진행하였으며, 각 LAMP 반응이 끝난 후 증폭산물들은 1.5% agarose gel을 이용하여 100V에서 25분간 전기영동 (Mupidone, Advance, Japan)하였다.

Agarose gel은 ethidium bromide(Sigma Chemical Co.)로 염색하여 UV transilluminator에서 관찰하였다. 50.0~61.0℃의 범위에서 KV-specific DNA가 신장되는 것을 확인하였으며(Fig. 2), KV-LAMP(s)의 최적 등온 온도는 반복실험을 통하여 56℃로 측정되었고, 이후의 실험은 측정된 온도인 56℃에서 수행하였다.

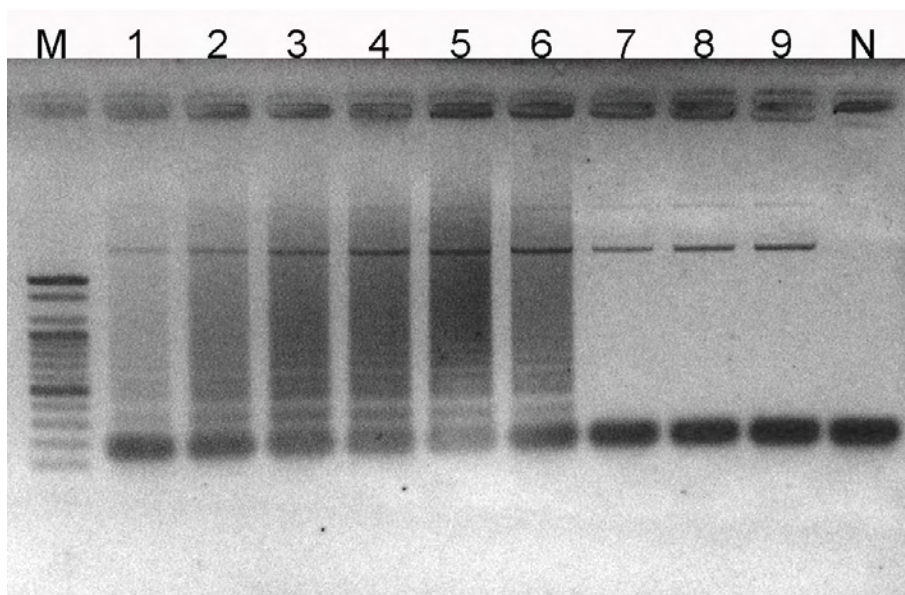


Figure 2. Temperature gradient KV-LAMP(s).

Lane M is 100bp ladder(Bioneer, Korea). Lane 1 to 9 were specific LAMP product from each LAMP under isothermal temperature at 50.0°C, 51.3°C, 52.5°C, 54.2°C, 56.4°C, 58.9°C, 61.0°C, 63.9°C, 65.0°C, respectively. Optimal elongation temperature was determined at 59°C.

한편 KV-LAMP(s)의 최적 반응 조건을 확립하기 위하여 primer, dNTP의 최적 농도를 구하였다. Primer의 경우 inner primer가 각각 100pmole, outer primer가 각각 25pmole 일 때 가장 많은 LAMP 생성물이 형성되었으며(Fig 3), dNTP의 경우 5mM일 때, DNA의 신장이 가장 잘 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig 4).

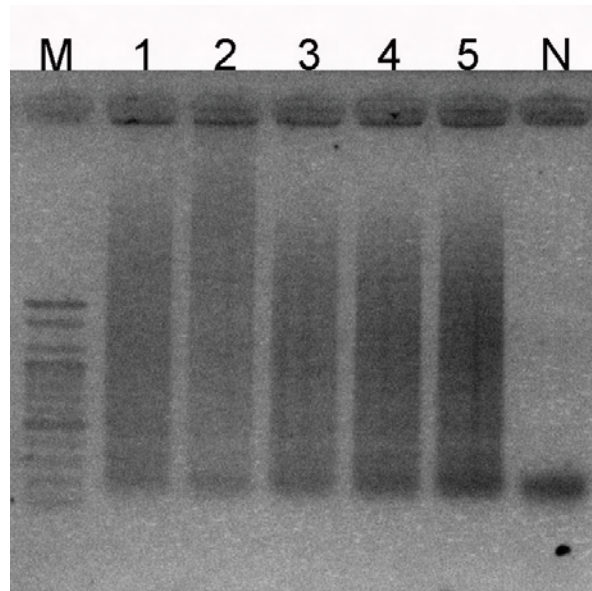


Figure 3. The optimal concentration of reaction solution(primers).

The optimal concentrations of primers. Lane M is 100bp ladder(Bioneer, Korea). Lane 1, KV-LAMP(s) using 20pmole KV-FIP(2)/BIP(2), and 5pmole KV-F3(2)/B3(2); Lane 2, KV-LAMP(s) using 40pmole KV-FIP(2)/BIP(2) and 10pmole KV-F3(2)/B3(2); Lane 3, KV-LAMP(s) using 60pmole KV-FIP(2)/BIP(2), and 15pmole KV-F3(2)/B3(2); Lane 4, KV-LAMP(s) using 80pmole KV-FIP(2)/BIP(2), and 20pmole KV-F3(2)/B3(2); Lane 5, KV-LAMP(s) using 100pmole KV-FIP(2)/BIP(2), and 25pmole KV-F3(2)/B3(2). Lane N, 0pmole KV-FIP(2)/BIP(2) and 0pmole KV-F3(2)/B3(2).

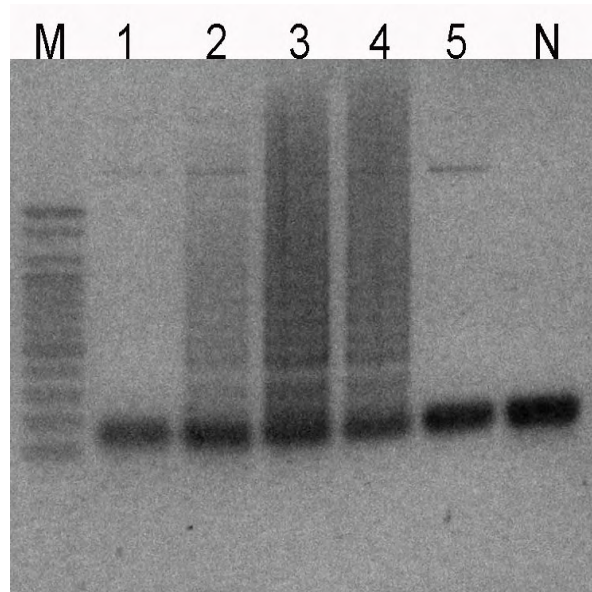


Figure 4. The optimal concentration of reaction solution(dNTP).

The optimal concentrations of dNTP. Lane M is 100bp ladder(Bioneer, Korea). Lane 1 to 5, LAMP products using 1.25mM; 2.5mM; 5mM; 7.5mM; 10mM dNTP. The optimal concentration of dNTP was determined at 5mM. Lane N is negative control.

(2) KV-LAMP(s)의 최소 반응 시간 확인

KV-LAMP(s)의 최소 반응 시간을 확인하기 위하여, 반응시간을 10~60분으로 각기 조정 한 뒤, 증폭 산물 생성 정도를 비교하였다. 반응시간이 40분 이상일 경우 증폭이 이루어지는 것이 확인되었다(Fig 5). 따라서 KV-LAMP(s)는 40분 이상의 반응 시간이 주어진다면 KV 검출이 충분히 가능한 것으로 여겨진다.

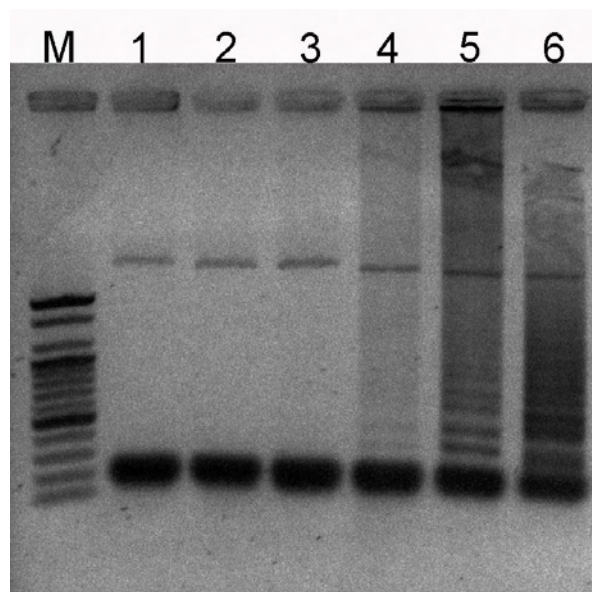


Figure 5. Determination of minimum reaction time of KV-LAMP(s).

KV-LAMP(s) was performed under range of 60min to 10min as reaction time after denaturation step. Lane M is 100bp ladder marker(Bioneer, Korea). Lane 1 to 6 were carried out at 10, 20, 30, 40, 50 and 60min, respectively. KV-LAMP(s) products could be amplified in 40min reaction time.

즉, KV-LAMP(s)를 위한 최적 반응액 조성은 총 20 μ l를 기준으로, 각각 100pmole의 inner primer, 각각 25pmole의 outer primer, 5mM dNTP, 10 \times Reaction buffer, 8U *Bst* DNA polymerase(NEB, U.S.A)로 확인되었으며, 56 $^{\circ}$ C의 등온조건에서 60분간 수행하는 것을 KV-LAMP(s)의 표준조건으로 확립하였다.

(3) KV-LAMP(s)의 민감도 확인

KB-LAMP(s)의 검출한계를 측정하기 위하여 pBX-KV plasmid를 1 $\times 10^7$ copies부터 1 $\times 10$ copies까지 1/10씩 단계별로 희석한 후, 희석액 1 μ l를 주형으로 사용하였다. 검출한계 측정 결과 1 $\times 10^2$ copies까지 KV-LAMP(s)를 통해 검출할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig 5).

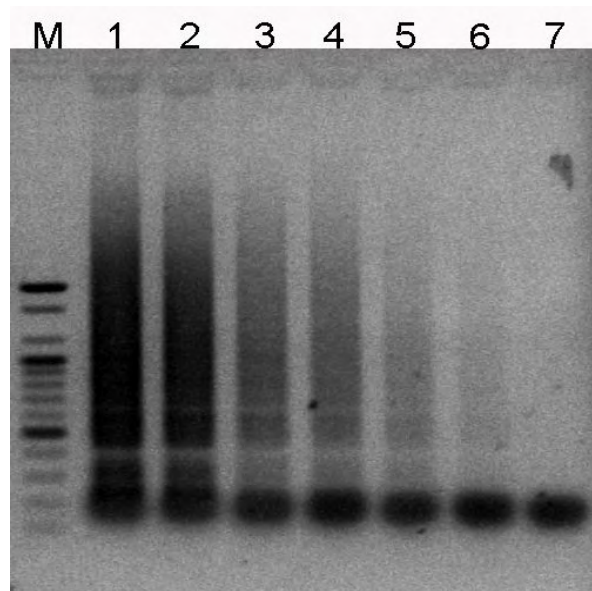


Figure 5. Sensitivity test of primers in KV-LAMP(s). Detection limit of KV-LAMP(s).

pBX-KV plasmid solution containing 1 $\times 10^7$ copeis/ μ l was serially 10-fold diluted. Lane M is 100bp ladder Marker (Bioneer, Korea). Lane 1, KV-LAMP(s) with using 1 $\times 10^7$ copeis/ μ l.

Lane 2, KV-LAMP(s) with using 1×10^6 copeis/ μ l. Lane 3, KV-LAMP(s) with using 1×10^5 copeis/ μ l. Lane 4, KV-LAMP(s) with using 1×10^4 copeis/ μ l. Lane 5, KV-LAMP(s) with using 1×10^3 copy/ μ l. Lane 6, KV-LAMP(s) with using 1×10^2 copy/ μ l. Lane 7, KV-LAMP(s) with using 1×10 copy/ μ l.

(4) Fluorescent Dye test

KV-LAMP(s) 표준조건에 의해 증폭된 DNA를 전기영동을 하지 않고 바로 관찰하기 위하여 SYBR Green I, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye 시약을 이용한 증폭여부 확인법을 개발하였다. DNA 이중가닥에 삽입되어 녹색의 형광을 발현하는 SYBR Green I의 경우에는 UV transilluminator 상에서 관찰하였다. Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye는 형광등 아래에서 관찰하였다.

SYBR Green I을 사용한 경우(Fig. 6A)에는 positive control이 좀 더 밝은 형광을 나타내었고 Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용한 경우(Fig. 6B)에는 positive control에서는 노란색, negative control에서는 주황색으로 발현되었다. 이처럼 색이 변하는 것을 확인할 수 있었기에, 현장진단에 매우 유용할 것으로 사료된다.

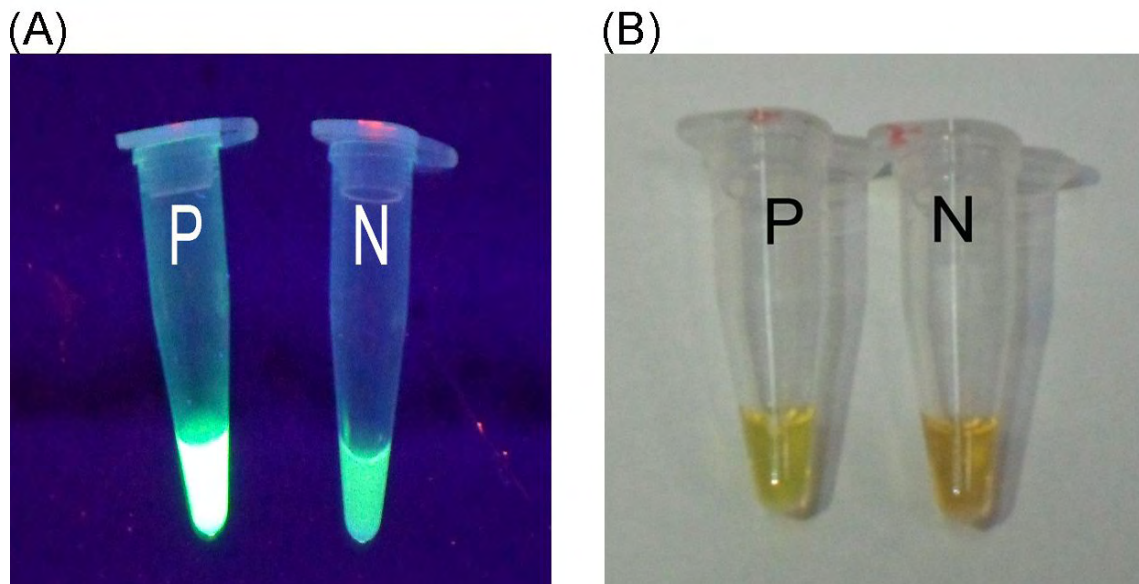


Figure 6. Fluorescent test of KV-LAMP.

Panel A. LAMP product (P) and negative control(N) were stained by SYBR Green I. Each products were observed by ultraviolet transilluminator. Panel B. LAMP product(P)

and negative control(N) were stained by Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye.

본 연구는 Kakugo Virus를 양봉현장에서 신속하고 정확하게 검출하기 위하여 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)를 이용한 진단법을 이용하였다. KV-LAMP(s)로 명명된 본 진단법은 56℃의 반응온도에서 최적의 활성을 보이며 최적 조건 내에서 반응 당 1×10^2 copy수의 검출이 가능함이 입증되었고, 최소 40분의 반응 시간 만으로도 증폭이 가능한 것으로 확인되었다.

이는 기존의 LAMP가 60분의 반응 시간이 필요한 데 비해 20분의 시간을 단축함으로써 좀 더 빠른 진단이 가능함이 입증되었다. 또한 SYBR Green I, Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye 시약을 이용하면 전기영동 없이 맨눈으로 DNA 신장여부를 확인할 수 있기에 현장적용에 무리가 없을 것으로 사료된다.

라. 적요

Kakugo Virus(KV)는 외관상으로는 건강하지만 공격적인 성향을 나타내는 일벌의 뇌에서 분리된 picorna virus 계열의 virus이다. 본 연구에서는 양봉 현장에서의 신속한 KV의 진단을 위하여 loop-mediated isothermal amplification법을 이용하여 KV를 검출 가능한 진단법을 개발하였으며, 이를 KV-LAMP(s)라 명명하였다. 이 방법은 기존의 KV-LAMP보다 20분 빠르게 진단할 수 있는 장점이 있다.

KV의 특이적인 염기서열에 근거한 KV-F3(2) / B3(2) / FIP(2) / BIP(2), 4개의 primer를 사용하여 56℃의 등온조건하에서 40분간 정치하여 KV의 DNA가 1×10^2 copies/ μ l까지 성공적으로 증폭됨을 확인하였다. SYBR Green I 과 Gene-Finder™ Nucleic acid fluorescent dye를 사용하여 전기영동 없이 육안으로 관찰할 수 있었다. 따라서 KV-LAMP(s)법은 KV를 신속하고 정확하게 검출함으로써 양봉현장에서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 판단된다.

제 11 절 꿀벌 질병의 원인체에 대한 배양법 확립

1. 미국부저병의 원인균인 *Paenibacillus larvae*의 배양법

가. 균체의 배양

(1) 배지: BHI 배지:

Name	Component	Amount to add per 1liter
BHI	Brain Heart Infusion	37.0g
	Agar powder (고체배지 제조)	10.0g

* nalidixic acid 15 μ g/ml의 첨가: 이는 *P. larvae*의 선택배양에 사용되나, 순수 배양균에 대한 증식배양에서는 생략이 가능하다.

(2) 배양조건

(가) 호기배양: 일반적으로 계대배양일 경우 37 $^{\circ}$ C, 24시간이면 충분한 수준으로 배양되나, 성장이 완숙기에 들어설 경우, 쉽게 자기용해(self-lysis)가 일어나는 경우가 있으니, 25 $^{\circ}$ C, 48시간을 기준으로 수시 관찰하며 성장시킴이 안전하다.

* 자기용해(self-lysis): 액체배양의 경우 배양액 바닥에 점액성의 물질이 발견되며, 고체배양의 경우는 균락이 점액성으로 용해된다.

(나) 액체배양액은 620nm에서 OD 측정 후, Glycerol 첨가후 소분하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하는 것이 가능하나, *P. larvae*는 매우 견고한 아포를 만들어 생존할 수 있기에 아포로 변환시켜 이를 상온에 보관하는 것이 보다 안전하다 (최대 30년 생존한 기록이 있음)

나. 아포(Endospore)의 배양

(1) 배지: AK 배지 (Sporulation Agar AK)

Name	Component	Amount to add per 1liter
AK agar	Gelatin, powder	6.0g
	skim milk	4.0g
	Yeast extract	3.0g
	Beef extract	18.0g
	Dextrose	1.0g
	Manganouse sulphate	0.3g
	Agar	15.0g

* nalidixic acid(15mg/ml)농축액을 최종농도 15 μ g/ml가 되도록 agar 배지를 적당히 식힌 후 첨가 (예; 농축액 1 ml를 1 liter agar 배지에 첨가)

(2) 배양 방법

(가) AK agar plate에 가급적 많은 양의 균체를 도말하며, 배양온도는 37 $^{\circ}$ C (또는 25 $^{\circ}$ C), 호기 조건이다., 배양은 수시로 관찰하여야 하며 보통은 5일, 가능하면 7일 지난 후 판정한다.

(나) 도말된 균체들은 배양 중 흰색으로 말라있는 형상을 나타내며, 이를 Scrapper로 긁어내고 그 분말을 수거하여 제습조건에서 상온 보관한다.

참고: 또한 Scrapper로 긁어낸 분말은 다음과 같이 보관할 수 있으나, 그 보관 가능 기간은 측정되지는 아니 하였다. 즉, 적당량 멸균 PBS에 균체분말을 부유시키고 원심분리하여(1,300g x 15min, 2~3 회, 일반 table top 원시기로는 3,000rpm), 침전물을 수거한 후, 최종 PBS에 부유시킨다. 이는 620nm에서 OD 측정 후, 소분하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관한다.

다. P. larvae 의 확인

(가) P. larvae의 확인은 일반적으로 PCR 검사법에 의존하나, P. larvae의 nalidixic acid 저항성, 포자형성능, 그람염색, 포자염색등 미생물학적 방법으로 그 진위를 확인할 수 있다.

참고균주: ATCC9545 (*Paenibacillus larvae*; Type strain), ATCC25745 (*Paenibacillus larvae*), SJ23 (*Paenibacillus larvae* (국내분리주)).

(나) P. larvae의 확인을 위한 미생물학적 검사

1) 코니칼 튜브에 BHI배지 30ml을 담고 P. larvae 보관균 1ml를 접종하여 25 $^{\circ}$ C 에서 24~48시간 배양한다.

- 2) 배양징후가 나타나면 test tube에 BHI배지 3ml를 담고 1차 배양액 10 μ l를 접종하여 25 $^{\circ}$ C에서 16~24시간 계대배양한다.
- 3) 그람염색: 배양되면 그람염색을 수행하여 그람양성균인지 확인한다.
- 4) Nalidixic acid 저항성: 선별과정으로 nalidixic acid가 15 μ g/ μ l 농도로 들어있는 BHI 고체배지에 streaking하여 25 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양하여 형성된 colony만 다시 배양해서 그람염색을 수행한다.
- 5) 선별된 P. larvae 배양액 1ml를 nalidixic acid가 15 μ g/ μ l 농도로 첨가된 포자배지에 도말하고 25 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양한다.
- 6) 1차 포자염색: 형성된 포자는 포자염색방법으로 확인한다
- 7) 포자형성능에 의한 선별: 형성된 포자는 모두 긁어 모아 BHI 액체배지 1ml가 담긴 e-tube에 담고 shaking한 후 70 $^{\circ}$ C에서 10분 incubation하고 다시 포자배지에 도말하여 25 $^{\circ}$ C에서 배양하는 선별과정을 수행한다.
- 8) 2차 포자염색: 마지막으로 형성된 포자를 포자염색 하여 확인 한다

라. 포자염색법

- (1) 슬라이드 글라스에 D.W 한방울을 떨어뜨리고 배양된 포자를 loop에 소량 묻혀 슬라이드 글라스 위의 D.W에 섞어 얇게 펴 바른다.
- (2) 상온에서 건조시킨다.
- (3) malachite green 염색시약을 떨어뜨리고 알콜 램프를 이용하여 일정거리를 두고 슬라이드 글라스를 5분 동안 가온하여 포자를 고정 시킨다
- (4) D.W로 조심히 washing하고 safranin을 떨어뜨린 후 1분 30초간 반응시킨다. (대조염색)
- (5) D.W로 조심히 washing하고 D.W 한 방울을 떨어뜨린 후 커버글라스를 기포가 생기지 않게 덮는다.
- (6) 저배율로 관찰하고 이물질 오일을 떨어뜨리고 1000배율로 관찰한다.

2. 유럽부저병의 원인균인 *Melissococcus plutonius*의 배양법

가. 균체의 배양

참고 균주: ATCC 35311 (*Melissococcus plutonius*):절대혐기성

나. 배지

* ATCC에서는 *Melissococcus plutonius* ATCC35311을 배양하기 위하여 ATCC 1430배지를 추천하였으나, 그 배지에서는 해당균주가 제대로 성장하지 아니하였다.

***Melissococcus plutonius* ATCC35311의 배지는 제주대학교 손원근교수가 개발한 KSBHI배지에서 제대로 성장하였으며, 따라서 본 연구에서는 KSBHI배지를 강력히 추천한다.

(1). KSBHI 배지(고체배지)

Name	Component	Amount to add per 1liter
KSBHI	Brain Heart Infusion	37.0g
	KH ₂ PO ₄	20.4g
	Soluble starch	10.0g
	Agar powder	18.0g

(2). KSBHI 배지(액체배지)

Name	Component	Amount to add per 1liter
KSBHI	Brain Heart Infusion	37.0g
	KH ₂ PO ₄	20.4g
	Soluble starch	10.0g

다. 배양조건

* *Melissococcus plutonius* ATCC35311은 절대 편성혐기성 균주로서 배양 중 혐기조건을 유지하는 것이 중요하다.

* 혐기조건 조성1: 배양전 가급적 새로이 배지를 조성하여 사용하고, 단기 보관에는 보관용기에 가급적 액체배지를 가득넣어 접촉될 수 있는 여분의 공기양을 최소화 한다.

* 혐기조건 조성2: 제조된 배지는 color indicator로 Rasazurin (1 mg/ 1 liter 배지)을 첨가하여, 배양 전 또는 배양 중 분홍색이 나타나지 아니하였는가를 검사한다.

* 혐기조건 조성3: anaerobic jar를 사용할 경우, 화학적으로 환원시킨 steelwool 덩어리를 jar내에 넣어주면, jar내의 여분의 산소를 제거할 수 있으며, 배양 중 환원시킨 steelwool 덩어리(밝은 회색)가 흑색으로 변하지 않는다면 *Melissococcus plutonius* ATCC35311의 배양에 충분한 혐기상태임을 알 수 있다.

* 혐기조건 조성4: Gas Pack의 사용도 *Melissococcus plutonius* ATCC35311의 배양에 충분한 혐기상태를 조성하였다.

- (1) Gas pack 또는 anaerobic jar를 이용하여 혐기배양한다.
- (2) 배양온도는 30℃를 유지하되, 암처배양을 권장한다 (투명한 배양기는 빛에 의한 온실효과로 인하여 기내 기온이 상승될 수 있음)
- (3) 액체배지에서 배양할 경우 50ml tube에 KSBHI배지를 가득 넣고, 균 접종 후 정지배양 (shaking없이 배양). 균의 성장은 바닥부터 하얗게 자라는 것으로 관찰할 수 있다.
- (4) 약 5일 배양 후에 원심분리하여 수거, 일반 table top 원심기로 13,000rpm, 10분
- (5) 최종 PBS에 부유시킨 후 620nm에서 OD 측정한다.
- (6) 최종농도 15%이상 Glycerol을 첨가하고, 소분하여 -70℃에 보관한다.

3. 백목병의 원인균인 *Ascosphaera apis* 의 배양법

가. 참고균주:

Ascosphaera apis var. *apis* (KACC 41774), 백목병원균

Ascosphaera apis var. *apis* (KACC 41775), 백목병원균

Ascosphaera apis var. *major* (KACC 41610), 백목병원균

Ascosphaera apis var. *major* (KACC 41778), 백목병원균

나. 배지

(1) PDA (Potato Dextrose Agar)

* PDA배지의 조성

Dextrose	20.0g
Potato starch (from infusion)	4.0g
Agar	15.0g
DW	adjust to 1000ml
Total	1.0 liter

* 배지 조성후 pH 5.6으로 조정하여 121°C, 고압 (15psi), 15분 멸균 처리(Autoclave).

* 배지를 50-55°C로 식힌 후, 10% tartaric acid (주석산)을 무균적으로 첨가하여 pH 3.5로 조정.

* 40°C로 배지를 식힌 후, Petri dish에 분주하고, 1시간 건조 후 사용.

* Autoclave전에 배지가 pH 3.5로 산성화되면, autoclave 중 agar가 가수분해되어 배지가 고형화되지 않을 수 있으며, 이 이유로 Autoclave전에는 pH 5.6으로 조정하여야 함 (agar의 함량을 1.5%가 아닌 2.0%로 조정하는 것도 유효함).

* PDA배지의 최종 pH 3.5는 세균의 성장을 억제하여 진균의 성장을 도우려는 것임

* 시판되는 Difco 또는 BBL 상표의 PDA는 분말의 형태로, 이중 39 g을 증류수에 녹여 1liter 배지로 만들며, 이때는 pH=5.6임. 따라서 바로 autoclave할 수 있고, 차후 위와 같이 pH를 조정함.

* 시판되는 Difco 또는 BBL 상표의 PDB (Potato Dextrose Broth)는, 분말의 형태로, 이중 24 g을 증류수에 녹여 1liter배지로 만들며, 이때는 pH=5.1임. 따라서 바로 autoclave할 수 있고, 차후 위와 같이 pH를 조정함.

* 출처; 이진성 등, DifcoTM & BBLTM Manual. Manual of microbiological culture media. BD.

(2) SDA배지와 SDA+Y (Sabouraud's Dextrose Agar +Yeast extract)배지

* DifcoTM의 SDA배지의 조성

Dextrose	40.0g
Peptic Digest of animal tissue	5.0g
Pancreatic Digest of Casein	5.0g
Agar	15.0g
DW	adjust to 1000ml
Total	1.0 liter

* Difco™ 또는 BBL™ SDA 배지는 65.0g을 증류수에 녹여 1.0 liter로 만들며, 잘 녹지 않기에 자주 진탕하여 녹인 후, 1분간 끓여 완전히 용해시킨다(과열주의, 배지가 물러지지 않도록 주의). 이때의 pH=5.6임.

* SDA+Y 배지는 이 SDA 배지의 조성에 Yeast Extract 5.0g을 첨가한 것임.

* 따라서 SDA+Y 배지의 제법은; Difco™의 SDA 65.0g에 Yeast Extract 5.0g을 가하여, 이들 70.0g을 증류수에 녹여 1 liter SDA+Y 배지로 만든 후, 121℃, 고압 (15psi), 15분 멸균 처리 (Autoclave)하고, 40℃로 배지를 식힌 후, Petri dish에 분주하고, 1시간 건조 후 사용함.

* 세균의 증식의 억제하고자 pH 3.5로 조정하려면, autoclave 후 배지를 50-55℃로 식혀, 10% tartaric acid (주석산)을 무균적으로 첨가하여 조정한다. 이후 petri dish에 분주.

* 출처; 이진성 등, Difco™ & BBL™ Manual. Manual of microbiological culture media. BD.

4. 노제마병의 원인균인 *Nosema apis* 의 배양법

Nosema apis 의 인공배양법은 보고된 바 없으며, 따라서 이 병원체를 분양하는 곳도 발견되지 아니하였다. 그러나 *Nosema apis* 와 근연종으로 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702를 들 수 있으며, 이를 배양하여 실험에 사용한 예가 보고 되었다(박용하 등, 2012; “무공해 양봉 생산 시스템을 위한 꿀벌 프로바이오틱스 미생물 제제 개발”, 농림수산부)

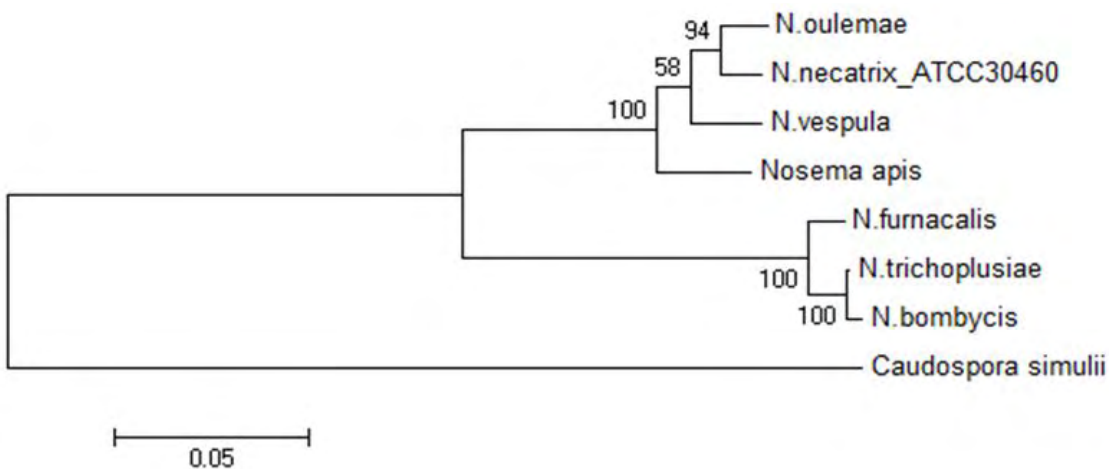


Figure 1. *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 계통 분류학적 위치 (박용하 등, 2012)

이 연구에서 *Nosema apis*와 근연종인 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702는 세포주인 ATCC CCL-80 (Antheraea cells, Ovrian tissue, Moth, Antheraea eucalypti)과 공배양을 시도하였으나, 포자의 발아를 발견할 수 없었다는 것이며, 실험조건은, 우선, ATCC CCL-80의 배양액으로 Grace's insect medium, 79%; heat-inactivated fetal bovin serum, 10%; whole egg ultrafiltrate, 10%; bovine plasma albumin, 1%를 사용하였고, 24°C CO₂ incubator에서 cell을 성공적으로 배양시킨 후, ATCC CCL-80 (1×10^5 cell/ml)를 96well plate에 옮겨 발아된 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702를 접종시키는 것이었다. 접종 후 35°C에서 3일 동안 배양하며 포자의 발아를 관찰하였으나 발아 되지 아니 하였다는 것이다.

또한 동 연구는 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702를 직접 누에에 감염시키는 방법인 Hatakeyama *et al.* (2003)과 Chakrabarti *et al.* (2008)의 방법을 꿀벌에 적용하였으며, 꿀벌사료인 설탕물에 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자를 혼합시켜 (1.5×10^4 spores/ml), 폐쇄된 꿀벌집단에 급이하고 7일후 감염여부를 확인하였다. 그 결과 꿀벌의 장에서 *Nosema trichoplusiae* ATCC 30702의 포자는 발아 증식됨이 꿀벌 장세척액에 대한 현미경 계수(1.2×10^8 spores/ml)와 PCR결과로써 확인되었다(박용하 등, 2012)

5. 꿀벌 바이러스들의 배양

꿀벌바이러스들의 인공배양법 또는 세포주와의 공배양법은 현재 보고된 바 없으며, 꿀벌 유래의 세포주 또한 보고된 바 없다.

따라서 이들 바이러스에 대한 연구는 자연계에서 감염된 꿀벌을 냉동보관하며 재 감염시켜 사용하는 것과 인공배양하는 애벌레를 이용하여 생체감염을 계속 계대하는 방법이 있을 것이다.

최근 Azzami 등 (2012) 독일 Wuerzburg대학팀은 Acute bee paralysis virus를 재료로 bee pupae를 이용하여 고농축하는 법과 larvae에 계대 감염시키는 법을 보고하였으니, Azzami, Klara, Wolfgang Ritter, Juergen Tautz, Hildburg Beier. 2012. Infection of honey bees with acute bee paralysis virus does not trigger humoral or cellular immune responses. Arch. Virol. 157:689-702.가 그것이다.

본 보고에서는 정확을 기하기 위하여 해당 부분을 원문으로 인용한다.

(가) bee pupae를 이용하여 ABPV를 고농축하는 법(Azzami *et al.*, 2012)

“Preparation of ABPV suspensions

A single highly purified virus suspension prepared at the CVUA laboratory (Freiburg, Germany) served as a source of acute bee paralysis virus (ABPV). For virus propagation, an ABPV suspension was injected into the haemocoel of white-eyed worker pupae of honey bees (*Apis mellifera*). The infected pupae were maintained in an incubator at 35°C for 3 days. Thirty bee pupae were crushed in 40 ml of 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 (PPB), 2 ml diethyldithiocarbamic acid and 1 ml chloroform. The mixture was

passed through cotton gauze, centrifuged at 4000 rpm for 30 min and incubated at 4°C for 16 h. The supernatant was centrifuged at 24,000 rpm for 4.5 h in a Beckman SW41 rotor. The precipitated virus was resuspended in 1 ml PPB, layered on a 10–40% (w/v) sucrose gradient and centrifuged at 21,000 rpm for 3 h in a Beckman SW28 rotor. The virus fraction was recovered, layered on a 30–60% (w/v) CsCl gradient and centrifuged at 40,000 rpm for 18 h in a Beckman SW41 rotor. The virus-enriched fraction was dialyzed against PPB. The concentration of ABPV in the purified preparation was $A_{260} = 5.0$, corresponding to 1 mg/ml [6] and equivalent to about 10^{12} particles/ml [22]. The A_{260}/A_{280} ratio was 1.7. RT-PCR analysis revealed the complete absence of sacbrood virus (SBV) and minor contaminations by deformed wing virus (DWV) in the ABPV preparation.“

(나) bee larvae를 이용하여 ABPV를 생체 계대배양하는 법(Azzami *et al.*, 2012)

In vitro rearing of worker bee larvae and septic wounding

Larvae were collected from a comb with a special grafting tool and transferred to a 24-well tissue culture plate filled with 300 μ l of basic diet, consisting of 4.2 g freeze-dried royal jelly powder, 0.6 g fructose, 0.6 g glucose, 0.2 g Difco yeast extract and 14.4 ml sterile deionised water according to Peng *et al.* [40]. The larvae were maintained in an incubator (Mettler, HCP108) at 35 °C and 70% relative humidity. Each day, they were transferred to new tissue culture plates filled with fresh nutrients. As determined previously, larval weight is a useful index of age [41]. For artificial infection with ABPV or *E. coli*, fourth-instar larvae with an average weight of 40–60 mg were employed. The larvae were injected dorsally with either 1 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) or with 1 μ l of appropriate amounts of *E. coli* cells and ABPV particles as described [41] and as indicated in the legend to figures.

Haemolymph collection

At the indicated times after septic and aseptic wounding, all challenged larvae or adult bees were bled by puncturing the abdomen with a fine-tipped glass capillary (see above). The collected haemolymph was transferred to reaction tubes containing mixtures of N-phenylthiourea (PTU) and aprotinin as described [41]. The samples were kept at –20 °C until further analysis.

제 12 절 꿀벌 질병시료에 대한 다중 병원체 검사체계

1. 시료의 접수 및 광학현미경 검사

가. 시료의 접수

- 1) 진단 의뢰서 접수하고 시료의 접수대장에 기록한다.
- 2) 기재사항 중 필수적인 것은 시료 도착일시, 시료 발송일시, 발송지 및 발송자 인적사항, 시료의 종류, 양 및 상태, 의뢰자가 지적한 병징 및 병명 등이다.
- 3) 접수된 시료가 시험에 부적절할 정도로 불량한 상태이면, 이를 기재하고, 시료 발송일시와 접수일시가 3 일 이상 차이가 있을 경우 이를 기재하며, 우송 방법 및 우송관련회사 등 원인을 파악하고 이를 개선한다.
- 4) 시료는 성봉의 경우 30마리, 유충의 경우 소비와 함께 절단하여(10cm x 10cm) 공기가 유통될 수 있도록 느슨히 포장한 것을 추천하고, 우송도중 압착에 의한 시료의 파손 등은 실험 후 진단서 발급에서 그 사실을 지적하고 발송자에게 개선하도록 홍보한다.
- 5) 기생성 시료(진드기 등)의 우송은 비닐, 병 등으로 밀봉하여 우송하여야 하며, 가급적 알콜로 액침된 시료 우송방법을 이용할 수 있도록 홍보한다.

나. 외형 관찰에 의한 예비 진단.

해부현미경을 이용한 꿀벌의 외부관찰에서 다음 사항의 유무를 검사하고, 기록하며, 사진촬영을 수행한다.

- 1) Varroa 등 외부 기생충의 존재 여부: 사진촬영 및 기생충 개체의 별도 보관
- 2) 날개불구의 증상 여부: Deformed wing virus가능성, 기재 및 사진촬영
- 3) 복부 팽만 여부: Nosema가능성, 기재 및 사진촬영
- 4) 복부 털의 다소 및 복부 색의 이상: 바이러스 질병 가능성, 기재 및 사진촬영
- 5) 유충의 색 및 짓무름 여부: 부저병 가능성, 기재 및 사진촬영.
- 6) 기타 정상에서 벗어난 외부 형태: 기재 및 사진촬영

다. 해부 검사에 의한 시료 채취 및 1차 진단

해부현미경을 이용한 꿀벌의 해부 검사에서 다음 사항의 유무를 검사하고, 기록하며, 사진촬영을 수행한다. 성봉의 중장관(mid-gut)의 내용물은 광학현미경 검사의 시료로 사용하고, 중장관의 색으로 노제마병의 감염에 대한 예진여부를 판정한다

- 1) 중장관(mid-gut)의 채취는 slide glass상에 성봉을 놓고,
- 2) 2개의 핀셋으로 꿀벌의 머리와 가슴을 각각 잡고 반대방향으로 당겨 뽑아내며,
- 3) 노출된 중장관이 유백색이면 노제마병 감염으로 1차 예진하고(사진촬영),

- 4) 증장관의 색이 갈색이면 정상으로 판정한다.
- 5) 양자 모두 slide glass상에서 핀셋으로 증장관을 파손시켜 내용물을 도말하며
- 6) 염색후 광학현미경으로 포자의 유무를 관찰한다.

라. 광학 현미경 검사

(1). 성봉시료에 대한 증장관 내용물의 광학현미경검사 (Nosema포자의 Gimsa염색)

Giemsa 염색을 수행하여, 노제마의 spore 및 진균류의 균사를 검사하고, 기록하며, 사진촬영을 수행한다.

- 1) slide glass상에서 성봉의 머리와 가슴을 2개의 핀셋으로 각각 잡고 잡아 당겨 증장관 (mid-gut)을 노출시키고(핀셋의 화염 멸균 실시),
- 2) 노출된 증장관부를 slide glass 중앙부에 위치시키고, 핀셋으로 절단한다.
- 3) 절단된 증장관에서 내용물이 잘 나올 수 있도록 머리 또는 가슴 부위의 증장관을 핀셋으로 압착하며 내용물을 절단부로 밀어낸다.
- 4) 내용물을 넓게 도말하고, 화염고정 후, Giemsa 염색을 수행하고 광학현미경에서 400배로 관찰한다.
- 5) Nosema spore의 크기는 3-5 μ m로, 400배 현미경 관찰에서는 대안 눈금자의 눈금으로 1-2칸이며, 이는 1000배율에서 3-5칸 크기이다.

(2). 유충시료에 대한 광학현미경검사 (P. larvae spore의 포자염색)

포자(Spore) 염색을 수행하여, 미국부저병(afb), 유럽부저병(efb) 등을 판정하며, 기록하고, 사진촬영을 수행한다.

- 1) slide glass상에서 유충을 파쇄한다(멸균봉, 멸균이쑤시게, 핀셋사용; 핀셋은 화염 멸균 실시),
- 2) 파쇄된 유충은 내용물이 잘 나올 수 있도록 내용물을 절단부로 밀어낸다.
- 3) 내용물을 넓게 도말하고, 화염고정 후, Spore 염색을 수행하고 광학현미경에서 400배로 관찰한다.
- 5) *Paenibacillus larvae subsp. larvae*는 2.5-5.0 μ m x 0.7-0.8 μ m의 크기이며, spore염색에서 0.6 μ m x 1.3 μ m크기의 endospore가 같이 관찰된다. endospore중앙부는 특히 밝게 보인다. Nosema spore의 크기는 3-5 μ m로, 400배 현미경 관찰에서는대안 눈금자의 눈금으로 1-2칸이며, 이는 1000배율에서 3-5칸 크기이다. 이 포자가 잘 관찰되면, 미국부저병으로 1차 진단하고, 이 시료를 배양하여 재검사한다(BHI배지 사용, 현미경 검사 및 PCR검사).
- 6) *Paenibacillus alvei*는 2.0-7.0 μ m x 0.8-1.2 μ m의 크기이며, *Paenibacillus larvae subsp. larvae*에 비하여 두꺼운 간균이다. 0.6 μ m x 1.3 μ m크기의 endospore를 만드나, 부저병의 원인균이 아니고 2차 감염균이다.

7) *Melissococcus pluton*는 유럽부저병의 원인균으로 크기는 0.5 μm x 1.0 μm 의 구상균(ovoid form)이며, spore를 형성하지 않는다.

8) 치사된 유충의 사체에 2차 감염되는 세균으로 주로 오진을 야기하는 세균들로 연쇄상 간균은 *Corynebacterium pyogenes*, 연쇄상의 구균은 *Streptococcus faecalis*이 있다. 현미경 검사에서 기재하고, PCR판정에 의해 진단한다.

2. 특이 유전자에 의한 꿀벌병원체의 검색

가. 유전자 검사의 개요 및 종류

유전자 검사는 세균 및 DNA virus의 검출을 위한 DNA검사와 RNA virus의 검출을 위한 RNA검사로 나눌 수 있다. 이 대상 병원체에 따라 각각 핵산을 추출할 수 있으며, 편이성을 위하여 DNA와 RNA가 동시에 추출되는 키트를 사용할 수도 있다.

- (1) 추출된 핵산은 최종적으로 PCR 또는 Reverse Transcription-PCR으로 판정한다.
- (2) 보다 빠른 판정을 위하여 Real-Time PCR, Reverse Transcription Real-Time PCR에 의해 판정할 수 있다.
- (3) 긴급한 빠른 PCR판정을 위하여, 또는 양봉현장에서 즉석판정을 위하여 Ultra-Rapid PCR 또는 Reverse Transcription PCR에 의해 판정할 수 있다.
- (4) 양봉현장에서 즉석판정을 위하여 LAMP (Loopmediated isothermal Amplification)법을 사용할 수 있다.

나. DNA 및 RNA의 순수분리

(1). DNA의 순수분리

(가) Proteinase K 에 의한 chromosomal DNA 분리

* 이 DNA 추출의 방법은 미국부저병의 *P.larvae* 그리고 유럽부저병의 *Melissococcus plutonius* 등 세균성 병원체, 그리고 백목병 및 석고병 등 균류와 Nosema의 DNA 추출을 목적으로 한 것이다. 꿀벌의 병원성 virus 중 DNA-genome을 가진 바이러스는 발견되지 아니 하였다.

- 1) 꿀벌 시료에 액체질소를 부어 급속 냉동시키고, 막자와 막자 사발을 이용하여 곱게 간다.
- 2) 이 세포의 분말은 DNA extraction까지 시료가 녹지 않도록 주의하며,
- 3) 시료에 567 μl TE-buffer를 넣고 micropipette을 사용하여 완전히 부유하고,
- 4) 30 μl 10% SDS와 3 μl 20mg/ml Proteinase K를 넣어, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1시간 배양한다. 배양 후 용액 전부가 점액화(viscous화) 된 것을 확인한다.

- 5) 100 μ l 5M NaCl을 가하고, invert mix한다.
- 6) 동량(0.7ml)의 phenol/chloroform을 넣고 약한 shaking으로 emulsion화 시킨다.
- 7) 12,000rpm, 상온의 centrifuge 1분으로 상하층을 분리하고, 상층의 DNA층을 새 tube에 옮긴다.
- 8) 동량(약 0.6ml)의 chloroform을 넣고 약한 shaking으로 emulsion화 시킨 후, 12,000rpm, 상온의 centrifuge 1분으로 상하층 분리하고, 상층의 DNA층을 새 tube에 옮긴다.
- 9) 새 tube에 옮겨진 DNA 용액에 0.6 Vol.의 isopropanol을 넣고 invert mix한다. 이 때 흰색 DNA 침전이 관찰되어야 하며, 15,000rpm, 상온의 centrifuge 15분 으로 DNA pellet을 침전시키고 상등액을 완전히 제거한다.
- 10) 침전이 들어 있는 tube에 1ml 75% ethanol을 넣어 1분간 shaking mix를 하여 여분의 염을 녹여 낸 후, 재차 15,000rpm, 상온의 centrifuge 15분으로 침전시켜 상등액을 완전히 제거한다.
- 11) 자연 건조로 DNA pellet을 30-60분 건조시킨다.
- 12) 100 μ l TE-buffer에 녹인 후, 바로 PCR검사에 사용한다.
- 13) 순수분리된 Chromosomal DNA 100 μ l에서 PCR 실험에 사용될 10 μ l는 냉장 보관하며 사용하고, 나머지 90 μ l의 DNA시료는 라벨 후 냉동보관한다. 라벨은 시료의 번호, 순수분리 연월일만 기록하고, 실험일지에 그 실험사항 및 보관위치 등을 상세히 기록한다.
- 14) 꿀벌시료, DNA시료, RNA시료 및 실험일지는 항상 상호 일치하도록 공통된 시료번호를 사용한다.

(나) Chromosomal DNA 분리와 RNA분리법의 통합.

사실 PCR detection의 방법은 매우 민감도가 뛰어나서, DNA의 분리와 RNA의 분리를 별도로 수행하고, 이를 핵산시료를 각기 PCR로 검사할 필요는 없다. 따라서 PCR 검사를 목적으로한 DNA와 RNA의 분리는, 핵산의 분리로 통합하여 시행함이 보다 간편할 수 있다.

(2). 꿀벌에서 핵산(DNA, RNA)의 순수분리

꿀벌의 질병시료로부터 DNA 또는 RNA genome을 갖는 꿀벌 병원체를 동시에 검사하기 위하여 DNA와 RNA 모두, 즉 핵산을 추출하는 것이 보다 편리하다. 본 보고에서는 이 방법을 추천하며, 별도로 꿀벌의 RNA virus 질병을 진단하기 위하여는 total RNA를 추출하여 RT-PCR 검사에 사용한다. 이 경우 RNA extraction은 easy-spin(DNA free) Total RNA Extraction Kit(INTRON사)을 사용하여 수행한다.

(가) 액체질소 분쇄법 및 DNA시료의 추출

- 1) 날개를 제외한 꿀벌 시료(100mg이하)에 액체질소를 가하여 동결시키고, 막자와 막자 사발을 이용하여 곱게 분쇄한다. RNA extraction 시까지 시료가 녹지 않도록 주의한다.
- 2) 1ml Lysis Buffer 넣고 강하게 vortex한 후, RT에서 10초간 정치한다. 덩어리가 보이지 않을때까지 vortex와 정치를 계속하고 ice에 정치한다 (부득이 보관을 할 경우, 4 $^{\circ}$ C냉장에서 보관

하되, 일주일 이내에 시료로 사용한다)

3) 원심분리 12,000 rpm, 20초로 침전시키고, 상등액 800ul를 취하여 그중 일부(200ul)는 DNA genome을 위한 PCR검사를 수행하고, 나머지(600ul)는 RNA extraction을 진행한다.

(나) Ultra-stirrer 분쇄법 및 DNA시료의 추출

1) 2ml용량의 centrifuge tube에 꿀벌 시료 1-3 개체(날개 제외), Silica Bead, Lysis buffer 1ml를 넣고, (단, RNA isolation의 용도에서는 200 ul Chloroform을 첨가하고 시행).

2) 시료 작업 전 냉동보관된 냉각용 Rack을 미리 얼음위에 정치하고, 작업 중 시료 tube는 항상 냉각용 Rack에 정치하고 작업함.

3) 시료 Tube를 MagNa Lyser에 setting하고, 그 강도를 6000 rpm, 20 sec, 로 조정 한 후, 2 회 반복으로 처리함. (시료의 균질화를 눈으로 확인, 냉각 유지를 위하여 신속 작업).

4) 원심분리 12,000 rpm, 20초로 침전시키고

5) 상등액 800ul를 취하여 그중 일부(200ul)는 DNA genome을 위한 PCR검사를 수행하고, 나머지(600ul)는 RNA extraction을 진행한다.

(다) RNA Extraction

* 본 실험은 Intron사의 easy-spin Total RNA Extraction Kit를 기반으로 기술되었다.

1) 액체질소 분쇄법 또는 Ultra-Stirrer분쇄법에 의하여 추출된 lysis buffer추출액(예, 400ul)에 1/2의 양인 200 μ l Chloroform을 첨가하고 30초간 vortex를 한다. Chloroform이 첨가되면, blue layer인 위층의 바로 밑으로 투명한 chloroform층이 형성된다.

4) 13,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10'의 원심분리를 수행하고, 400 μ l 상등액을 1.5ml tube로 옮긴다. 제일 위의 층은 맑은 수용액층(RNA와 작게 절단된 DNA)이며, 중간 층(흰색 퇴적물)은 protein과 genomic DNA 함유된 것이며, 제일 아래층은 갈색 또는 청색으로 단백질 및 cell debris가 포함된 유기용매층이다.

5) 채취한 수용액층과 동량, 즉 400 μ l의 Binding Buffer를 첨가하고 pipetting 또는 inverting 2-3회로 혼합한다. 이는 원심분리 없이 상온에서 1분간 정치한다.

6) 이 용액을 column에 넣고(최대 volume 800 μ l), 13,000rpm, 30초 원심분리하여 RNA를 column에 binding시키고 통과액은 제거한다.

7) 700 μ l Washing Buffer A를 column에 넣고, 13,000rpm, 30초 원심분리하여 column에 binding된 RNA를 세척시키고 통과액은 제거한다.

8) 700 μ l Washing Buffer B를 column에 넣고, 13,000rpm, 30초 원심분리하여 column에 binding된 RNA를 다시 세척시키며 통과액은 제거한다.

9) Column을 다시 13,000rpm, 1-2분 원심분리하여 column을 건조시킨다.

10) Column을 새로운 1.5ml tube에 옮기고, 50 μ l의 Elution Buffer를 column에 가하고 상온에

서 1분간 정치한 후, 13,000rpm, 1분 의 원심분리로 RNA를 elution 해낸다.

11) 추출된 RNA는 우선 labelling을 하고, 그 중 1 μ l를 사용하여 spectrophotometer로 RNA 농도를 측정하며, 가급적 바로 Reverse transcriptase reaction에 사용한다. RNA의 보관은 -70 $^{\circ}$ C 냉동보관한다.

다. Reverse transcriptase reaction

RNA Extraction 과정에서 추출된 total RNA는 Reverse transcriptase reaction을 거쳐 cDNA로 변환시킨다.

1) Primer의 binding은 농도가 측정된 2-3 μ g total RNA extraction 용액을 사용하며, 2 μ l Oligo dT 또는 hexamer mixer와 함께, 최종 volume을 20 μ l로 하여, 65 $^{\circ}$ C, 10분간 정치하고,

2) 아래와 같이 Reverse transcriptase reaction을 조성하여 40 $^{\circ}$ C, 90분간 반응시킨다.

DTT(100mM)	2 μ l
dNTP(2.5mM each)	1 μ l
PRI(10unit)	1 μ l
RTase	1 μ l
Reaction buffer	2 μ l
RNA solution	13 μ l
<hr/>	
total volume	20 μ l

라. 일반PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection

현재 꿀벌질병의 검사에 사용되는 PCR의 종류는 그 목적에 의하여 다양하며, (1) 일반 PCR, (2) 정량PCR, (3) 초고속 PCR이 그것이다. 현재 질병검사를 위하여 일반 PCR이 주로 사용되고 있으나, 대량의 시료를 처리하기 위하여 정량 PCR법으로 전환하여야 할 것이며, 신속한 현장검사를 위하여 초고속 PCR을 적극 활용하여야 할 것이다

(1) 일반 PCR에 의한 검사 및 전기영동.

꿀벌시료로부터 얻어진 DNA 및 RNA의 시료는 꿀벌의 병원성질병의 원인 세균, 원생동물 및 바이러스들의 핵산 뿐 아니라 꿀벌 자체의 핵산들도 포함되어 있다.

DNA시료 및 RNA에서 변환시킨 cDNA시료를 기질로 사용하여 PCR 증폭을 통하여 병원체의 존재를 확인한다.

현재 일반 PCR법에 의하여 검사가 가능한 꿀벌 질병은, DNA시료로부터 미국부저병, 유럽부저병, 백목병, 석고병, 노제마병의 2종 등 6종의 존재를 확인할 수 있으며, 꿀벌 바이러스질병 8종은 모두 RNA virus이기에 RNA시료로부터 변환시킨 cDNA시료를 기질로 RT-PCR을 실시한다. 현재 일반 PCR법에 의하여 검사가 가능한 꿀벌 바이러스질병은 9종으로, 봉아낭충부패병(SBV), 한국형 봉아낭충부패병(kSBV), 급성꿀벌마비병(ABPV), 날개불구병(DWV), Black Queen Cell Virus(BQCV), Kashmir Bee Virus (KBV), 만성꿀벌마비병(CBPV), 이스라엘 급성마비병(IAPV; Israel acute paralyti virus) 그리고 Kakugo virus (KV)이다.

표 1. 꿀벌 병원체 검색용 PCR의 조성

Template(chromosomal DNA 및 cDNA)	1 μ l
F-primer(10pmole)	1 μ l
R-primer(10pmole)	1 μ l
dNTP (2.5mM each)	1 μ l
10 \times PCR buffer(with 15mM MgCl ₂)	2 μ l
Taq polymerase(5U/ μ l)	1 μ l
D.W	13 μ l
Total volume	20 μ l

일반 PCR에서 기본 PCR조건은 94 $^{\circ}$ C, 5분의 pre-denaturation 후, 변성 94 $^{\circ}$ C, 15", 혼성 52 $^{\circ}$ C ~60 $^{\circ}$ C, 15", 중합 72 $^{\circ}$ C, 15" 로 45회전을 수행하고, 72 $^{\circ}$ C, 10' 의 post-polymerization이다. 그러나 각 질병의 진단에는 사용되는 primer에 따라 최적 annealing 온도에 차이가 있으며, 1개 시료에 대한 다종의 PCR검사를 시행할 경우 이를 주의 하여야 한다.

일반 PCR을 수행하고 전기영동으로 판정하는 경우, 판정의 수월성을 위하여 비교적 큰 PCR산물을 만드는 primer들을 사용하며, 정량 PCR 및 초고속 PCR에서는 200bp 내외의 비교적 작은 PCR산물을 만드는 primer들을 사용한다.

일반 PCR을 적용하였을 경우, 부가되는 전기영동법은 1xTAE agarose gel 전기영동법으로, 100V, 30분의 전기영동 및 EtBr염색, 그리고 자외선 조사를 통해 각 병원체 특이의 PCR산물을 찾아냄으로 그 병원체의 존재 여부를 판단한다. 그림 1은 이 판정의 예이다.

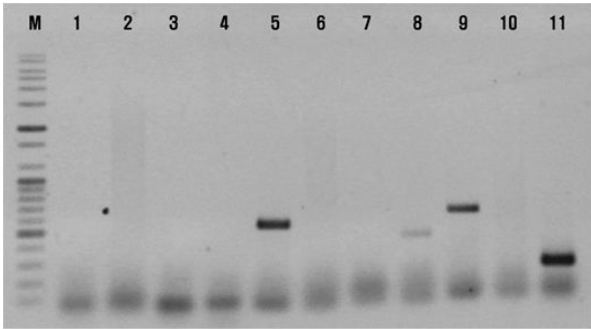


그림 1. 1개 질병시료에 대한 11종의 꿀벌 병원체에 대한 PCR detection (예)

충남서산의 시료로부터 11종의 꿀벌 병원체에 대한 PCR detection 결과이다. Lane M은 DNA molecular weight marker이며, 원생동물성 노제마, 바이러스성 DWV와 Black Queen Cell Virus의 병원체가 검색되었다. 상기 병원체의 복합감염으로 진단되었다.

- Lane 1 : 미국부저병(AFB)의 PCR detection(음성)
- Lane 2 : 유럽부저병(EFB)의 PCR detection(음성)
- Lane 3 : 백묵병(A.apis)의 PCR detection(음성)
- Lane 4 : 석고병(A.flavus)의 PCR detection(음성)
- Lane 5 : 노제마(Nosema)의 PCR detection(양성): 592bp
- Lane 6 : 낭충봉아부패병(SBV)의 PCR detection(음성)
- Lane 7 : 급성마비병(ABPV)의 PCR detection(음성)
- Lane 8 : 날개불구병(DWV)의 PCR detection(의양성): 479bp
- Lane 9 : 흑색여왕벌병(BQCV)의 PCR detection(양성): 700bp
- Lane 10 : 케시미어병(KBV)의 PCR detection(음성)
- Lane 11 : 이스라엘바이러스병(IAPV)의 PCR detection(양성): 237bp

마. 정량 PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection

(1) 개요.

보다 효율적인 꿀벌질병의 신속 검출법을 확립하기 위해 specific primer를 이용한 Real-Time PCR 신속검출법을 사용한다 있다. Real-Time PCR은 실시간으로 PCR의 결과를 볼 수 있는 실험기법으로, 전기영동이 필요 없는 이유로 다량의 시료를 보다 빨리 진단할 수 있는 장점이 있다. 이 실험법의 기기로는 Excyler™ Quantitative Thermal Block(Bioneer, Korea)을 사용하고 있으며, melting temperature curve의 분석을 함께 수행하여 결과물의 정확성을 증명하였다.

정량 PCR도, 일반 PCR과 같이, 꿀벌시료로부터 얻어진 DNA시료 및 RNA에서 변환시킨 cDNA시료를 기질로 사용하여, PCR 증폭과정에서 나타나는 형광의 강도를 통하여 각 병원체 특이 유전자의 증폭여부 판단하며, 파생되는 그래프를 통하여 병원체의 양을 계측한다.

현재 정량 PCR법에 의하여 검사가 가능한 꿀벌 질병은, DNA시료로부터 미국부저병, 백묵병,

석고병, 노제마병 등 4종의 병원체, 꿀벌 바이러스질병 6종, 즉 낭충봉아부패병(SBV), 한국형 낭충봉아부패병(kSBV), 날개불구병(DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV), 이스라엘 급성 마비병(IAPV; Israel acute paralyti virus) 그리고 만성꿀벌마비병(CBPV)은 RNA시료로부터 변환시킨 cDNA시료를 기질로 병원체에 대한 정성 및 정량을 할 수 있다.

(2) 정량 PCR의 조성 및 조건

정량 PCR에서 기본 PCR조건은 94℃, 5분의 pre-denaturation 후, 변성 94℃, 15", 혼성 52℃ ~60℃, 15", 중합 72℃, 15"로 45회전을 수행하고, 72℃, 10'의 post-polymerization이다. 그러나 각 질병의 진단에는 사용되는 primer에 따라 최적 annealing 온도에 차이가 있으며, 1개 시료에 대한 다종의 PCR검사를 시행할 경우 이를 주의 하여야 한다.

표 1. 꿀벌 병원체 검색용 정량 PCR의 조성

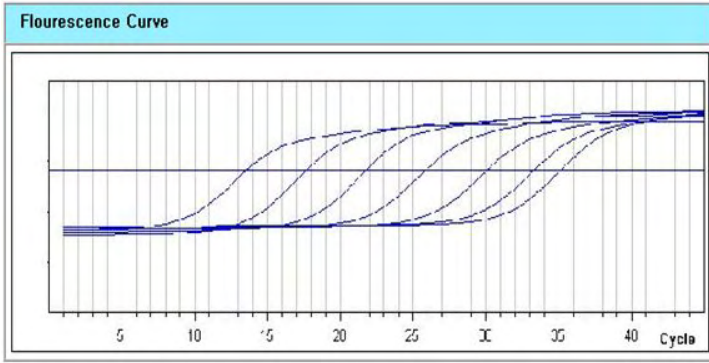
Template(chromosomal DNA 및 cDNA)	1 μ l
F-primer(10pmole)	1 μ l
R-primer(10pmole)	1 μ l
dNTP (2.5mM each)	1 μ l
10 \times PCR buffer(with 15mM MgCl ₂)	2 μ l
Taq polymerase(5U/ μ l)	1 μ l
D.W	13 μ l
Total volume	20 μ l

(3) 정량 PCR결과의 판정

각 병원체의 정량적 수(copies)은 이론 상 PCR의 template가 되는 특이 유전자의 수와 동일할 수 있다. 그러나 이는 *P. larvae*와 같은 세균일 경우 1개의 chromosome은 1개의 template로 작용할 수 있어 유효한 해석이나, 다세포 생물체인 진균의 경우 1개 template는 1개 세포에서 나온 것으로 해석할 수 밖에 없으며, 또한 RNA virus의 경우 cDNA로 변환과정에서 그 수가 크게 증가하기에 절대 정량을 하는 것은 불가능하다.

이런 이유로 RT-PCR에서 말하는 정량이란 극히 상대적인 것이며, 그 기준으로 클론화된 특이 유전자를 정량의 기준으로 사용할 수 밖에 없다.

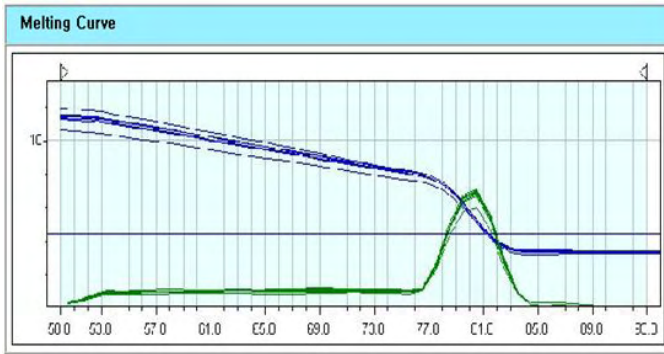
아래의 예는 DWV의 정량을 위하여 DWV 특이 유전자가 포함된 재조합 plasmid를 사용하는 것으로, 이 plasmid를 1ng에서 1fg 순차적으로 사용하여 정량용 standard curve를 작성한 것이다. Standard curve와 C_T 값을 통해서 초기 Template의 농도를 역산할 수 있다(그림 1).



Standard Curve Result		
Name	Concentration	C _T
DWV-C12	1ng	13.615
DWV-C12	100pg	17.719
DWV-C12	10pg	21.786
DWV-C12	1pg	25.895
DWV-C12	100fg	30.105
DWV-C12	10fg	33.367
DWV-C12	1fg	35.152

그림 1. DWV에 대한 standard real-time PCR

생산된 PCR 산물은 특이 유전자 고유의 Melting point 분석(T_m; Temperature of mid-point)을 통하여, 특이 유전자만이 증폭되었는지 확인할 수 있다(그림2).



T _m Result		
Name	Concentration	T _m
DWV-C12	1ng	80.59
DWV-C12	100pg	80.62
DWV-C12	10pg	80.57
DWV-C12	1pg	80.63
DWV-C12	100fg	80.61
DWV-C12	10fg	80.58
DWV-C12	1fg	80.59

그림 2. DWV에 대한 melting temperature analysis

시료에 대한 정량은 상기의 standard curve와 연계하여 알아 낼 수 있으며, 아래 그림은 그 예이다 (그림 3)

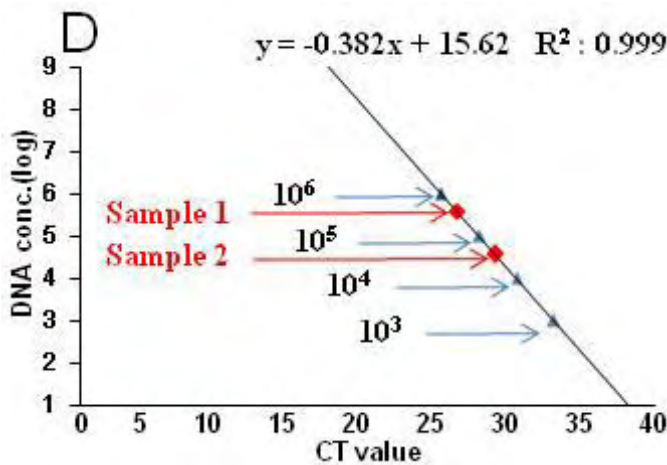


그림 3. DWV에 대한 standard curve의 regression에 의한 시료 1, 2의 정량.

바. 초고속 PCR을 사용하는 꿀벌질병의 detection

(1) 개요.

보다 신속한 꿀벌질병의 검출을 위하여 각 병원체에 대한 specific primer를 이용한 초고속 실시간 PCR (Ultra-rapid Real-Time PCR; UR-PCR 또는 URRT-PCR)을 사용한다. 초고속 PCR은 10분 이내에 PCR의 결과를 볼 수 있는 실험기법으로, 기본적인 실험방법은 실시간 PCR과 동일하다.

초고속 PCR의 10분 이내 라는 신속성은 양봉현장에서 즉시 병원균 검출과 진단을 수행할 수 있는 즉석판정(instant test)의 장점이 있으며, 이는 급속히 전파되는 바이러스성 꿀벌 전염병(근래의 kSBV의 예)에 대하여 신속한 대응을 추구할 수 있을 것이다.

이 Ultra-rapid Real-Time PCR 기기로서, GenSpector TMC-1000™ System(삼성테크윈, Korea)을 사용한다. 이는 열전도가 높은 실리콘과 백금으로 이루어진 micro heating plate와 microchip을 기반으로 하는 특수 tube를 사용하며, 또한 소량의 PCR반응액을 사용하여 측정하는 방식으로, 전체 반응시간의 단축을 가능하게 하였다.

한편, 같은 개념의 Ultra-fast PCR system (이레텍, Korea)이 근래 개발되었으며, 이는 8개의 PCR을 1개의 chip에 할 수 있는 발전을 이루었으며, 현장실험에 맞게 전원확보 등 휴대성 등을 크게 강화하였으나, 아직 양/음성만을 판정할 수 있는 (정량치 산출은 불가) 한계를 보이고 있다.

초고속 PCR도, 일반 PCR 및 정량 PCR과 같이, 꿀벌시료로부터 얻어진 DNA시료 및 RNA에서 변환시킨 cDNA시료를 기질로 사용하여, 정량 PCR과 같이, PCR 증폭과정에서 나타나는 형광의 강도를 통하여 각 병원체 특이 유전자의 증폭여부 판단하며, 파생되는 그래프를 통하여 병원체의 양을 계측한다.

현재 초고속 PCR법에 의하여 검사가 가능한 꿀벌 질병은, DNA시료로부터 미국부저병, 백목병, 석고병, 노제마병 등 4종의 병원체, 꿀벌 바이러스질병 6종, 즉 낭충봉아부패병(SBV), 한국형 낭충봉아부패병(kSBV), 날개불구병(DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV), 이스라엘 급성마비병(IAPV; Israel acute paralyti virus) 그리고 만성꿀벌마비병(CBPV)은 RNA시료로부터 변환시킨 cDNA시료를 기질로 병원체에 대한 신속한 정성 및 정량을 할 수 있다.

(2) 초고속 PCR의 조성 및 조건

정량 PCR에서 기본 PCR조건은 92℃, 15초의 pre-denaturation 후, 변성 92℃, 1초, 혼성 52℃ ~60℃, 1초, 중합 72℃, 3초로 45회전을 수행하고, 72℃, 10초의 post-polymerization이다. 그러나 각 질병의 진단에는 사용되는 primer에 따라 최적 annealing 온도에 차이가 있으며, 매우 민감한 실험법이기에 1개 시료에 대한 다종의 PCR검사를 시행할 경우 이를 주의 하여야 한다.

표 1. 꿀벌 병원체 검색용 초고속 PCR의 조성

Template(chromosomal DNA 및 cDNA)	1 μ l
F-primer(10pmole)	1 μ l
R-primer(10pmole)	1 μ l
2X SYBR green Master Mix	3 μ l
Total volume	6 μ l

(3) 초고속 PCR결과의 판정

초고속 PCR의 판정은 기본적으로 정량 PCR법과 동일하며, 그 진행속도를 10분 이내로 하였다 는 것이 의미가 있다. 따라서 정성이 아닌 정량 실험에서는 정량 PCR과 같이 standard curve 를 작성하여야 하며, 정확한 정성을 위하여 특이 유전자의 증폭 뿐아니라, 특이 유전자 고유의 Melting point 분석(Tm; Temperature of mid-point)을 통하여, 특이 유전자만이 증폭되었는지 확인할 수 있다. 초고속 PCR의 판정은 기본적으로 정량 PCR과 동일하기에 이하의 기술은 생략한다.

사. PCR detection용 primer쌍 (일반 PCR용, 정량 및 초고속 PCR용)

(1) 미국부저병균 *Paenibacillus larvae*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
미국부저병 (16s)	AFB16sNF	GTG TTT CCT TCG GGA GAC G	233	<i>Paenibacillus larvae</i> / PCR
	AFB16sNR	CTC TAG GTC GGC TAC GCA TC		
미국부저병 (Mtp)	AFB MtpF3	ACTCACGGAGCTACAGAACA	229	<i>Paenibacillus larvae</i> / PCR/ Phu et al., 2011. JA26(3)
	AFB1MtpB3	CCGAAGGTCCTTTGTAACGA		
미국부저병 (16S)	AFB 16SNF	GTGTTTCCTTCGGGAGACG	233	<i>Paenibacillus larvae</i> / UR-PCR/ Han et al., 2008. JIP
	AFB 16SNR	CTCTAGGTCGGCTACGCATC		

(2) 유럽부저균 *Melissococcus plutonius*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
유럽부저병	EFB-NSF	AAG AGT AAC TGT TTT CCT CG	564	<i>Melissococcus plutonius</i> /(RT-) PCR/ Ha et al., 2006.
	EFB-NSR	ACG CCT TAG AGA TAA GGT TT		
유럽부저병 (gyrase)	EFB-gyrF3	CGCCCAATTGTTGAAGCT	229	<i>Melissococcus plutonius</i> / PCR/ Phu et al., 2012.
	EFB-gyrB3	CGTCTCCCACAATTGATGA		

(3) 백목병균 *Ascospaera apis*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
백목병 (18S)	Asco18S-F	GGC TGT AGG GGG GAA CCA GGA	994	<i>Ascospaera apis</i> / PCR
	Asco18S-R1	CGG GTG GTC GTT TCC AGC CTC		
백목병 (18S)	Asco18S-F	GGCTGTAGGGGGGAACCAGGA	701	<i>Ascospaera apis</i> / PCR
	Asco18S-R2	CCTCAAACCTCCATCGGCTTAAGAA		
백목병	QP-Asco F	TTA GAG GGA CTA TCG GTT CT	148	<i>Ascospaera apis</i> / RT-PCR
	QP-Asco R	TAA CAA GAT TAC CCA GAC CT		
백목병 (18S)	<i>A.apis</i> -F3	GCCGATGGAAGTTTGAGGC	228	<i>Ascospaera apis</i> / UR-PCR/ Lee at al., 2011
	<i>A.apis</i> -B3	ACAAGCTGATGACTTGCGC		

(4) 석고병균 *Aspergillus fulavus*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
석고병	Asp 18S-F	ATC GGG CGG TGT TTC TAT G	312	<i>Aspergillus fulavus</i> / PCR
	Asp 18S-R	ACC GGG CTA TTT AAG GGC CG		

석고병	Fungi 18S UF	CGC GCA AAT TAC CCA AT	1210	<i>Aspergillus fulavus</i> / PCR
	Fungi 18S UR	GGC GGT GTG TAC AAA GG		

(5) 노제마병균 *Nosema apis*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
노제마병	Nosema-F	CTG CCT GAC GTA GAC GCT AT	592	<i>Nosema apis</i> / PCR
	Nosema-R	CTT CGA TCC TCT AGC TTA CG		

(6) 노제마병균 *Nosema cerana*의 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/문헌
노제마병	Nosema-F3	CTACGTTAAAGTGTAGATAAGATGT	212	<i>Nosema cerana</i> / PCR/ Lee <i>et al.</i> , 2010
	Nosema-B3	TCCCATAACTGCCTCAGAT		
노제마병	Nosema180-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	180	<i>Nosema cerana</i> / UR-PCR/ Yoo <i>et al.</i> , 2008
	Nosema180-R	AGCTTTCGCTTCTGTTCGTC		

* Nosema180F와 Nosema230F는 동일한 염기서열임.

<i>Nosema cerana</i>	Nosema230-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	212	<i>Nosema cerana</i> / UR-PCR/ Yoo <i>et al.</i> , 2011.
	Nosema230-R	CTTCGATCCTCCAGCTTACG		

* Nosema180F와 Nosema230F는 동일한 염기서열임.

(7) ABPV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
ABPV	ABPV-PF	TTATGTGTCCAGAGACTGTATCCA	901	Acute Bee paralysis virus/ PCR
	ABPV-PR	GCTCCTATTGCTCGGTTTTTCGGT		

(8) BQCV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
BQCV	BQCV-F	TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC	700	Black Queen Cell Virus
	BQCV-R	GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC		
BQCV	BQCV-RTF	TCG CAG AGT TCC AAA TAC CG	159	Black Queen Cell Virus/ UR-PCR/ Yoo et al., 2011
	BQCV-RTR	TAT CAT CTC CCG CAC CTA CC		
BQCV	BQCV-Q-F	ATA GCC ACT TCA CCT CCT TCC	59	Black Queen Cell Virus/ UR-PCR/ Yoo et al., 2011
	BQCV-Q-R	ATA TCA TCT CCC GCA CCT ACC		

(9) CBPV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
CBPV	CBPV-F	AGT TGT CAT GGT TAA CAG GAT ACG AG	455	Chronic bee paralysis virus
	CBPV-R	TCT AAT CTT AGC ACG AAA GCC GAG		
CBPV	CBPV-F3	CATCAAACGGGAGTCCGG	228	Chronic bee paralysis virus/ No et. al., 2010
	CBPV-B3	ATCAAGGCGTACTTGCGG		

(10) DWV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
---------------	---------	------------------	-------------------	-------------------

DWV	DWV-F	TCATCTTCAACTCGGCTTTCTACG	479	Deformed Wing virus
	DWV-R	CGA ATC ATT TTC ACG GGA CG		
DWV	Q-DWV-F	TCA TCT TCA AAC TCG GCT TTC	121	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	Q-DWV-R1	CAG TCA ACG GAG CAT ACC AA		
DWV	Q-DWV-F	TCA TCT TCA AAC TCG GCT TTC	262	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	DWV-Q-R2	CAC ACA CTT CAC CAC AAG GA		
DWV	Q-DWV-F2	TTC AAC TCG GCT TTC TAC GG	194	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	Q-DWV-R3	TCG ACA ACT TTC GGA CAT CA		
DWV	Q-DWV-SF	TGT CCG AAA GTT GTC GAA AGA A	72	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	Q-DWV-SR	CACCACAAGGAACAGATAAATTAATCA A		
DWV	DWV-UR-F	TGTCCGAAAGTTGTCGAAAGAA	71	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	DWV-UR-R	CACCACAAGGAACAGATAAATTAATCAA		
DWV	DWV-UR-F3	GTTGTTTGAGAACCCAACTTG	133	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim et al., 2013
	DWV-UR-R3	CGCTTGCAACCACACTTCA		

(11) IAPV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
IAPV	IAPV-VP2-F3	GTTATAGGATTACCGTGGTGA	237	Israel acute paralysis Virus/ PCR/ No et al., 2011
	IAPV-VP2-B3	GAACACGTATTGTAACCTTCTGT		
IAPV	IAPV-162PF	AACGACCCGAACAAAAACAC	162	Israel acute paralysis Virus/ UR-PCR/ Kim et al., 2008
	IAPV-162PR	CGCAGGCATCATAACAACCT		

IAPV	IAPV-URRT203F	ACAATATGCAAAGGATCACC	203	Israel acute paralysis Virus/ U R - P C R / Unpublished
	IAPV-URRT203R	CATCCAACCTCCCAGAATTTA		

(12) KBV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
KBV	KBV-F	GAT GAA CGT CGA CCT ATT GA	415	Kashmir Bee Virus
	KBV-R	TGT GGG TGG CTA TGA GTC A		
KBV	KBV-F	GAT GAA CGT CGA CCT ATT GA	441	Kashmir Bee Virus
	KBV-R"	CAG TTA AGG GGT GTT GTT GC		

(13) KV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
KV	KV-F3(2)	TTAACGCTGAGCATGGTA	270	Kakugo Virus/ PCR/ Lee et al., 2012
	KV-B3(2)	ACTCGCTTCATTTTCGTCTT		

(14) SBV 및 kSBV 검색을 위한 PCR primer들

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/ PCR종류/ 문헌
SBV	SBV-F	ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG	258	Sacbrood virus
	SBV-R2	TCT TCG TCC ACT CTC ATC AC		

SBV/kSBV /cSBV	SBV-FV	GGT GTA TAT GCG AGG AGG	318bp SBV
	SBV-RV	GCA GTT TCA TCT TCA TCT TC	267bp kSBV
			279bp cSBV

* Lee *et al.*, 2012. JA27(2)

SBV	SBV-F3	CGCGAATGATGTCATCTGT	225	Sacbrood vitus/ PCR/ Lee et al., 2011.
	SBV-B3	ATCTTCCAACACTGCACCAC		

SBV	SBV3-824-F3	atc cag cgc gtc ttg agt	136	Sacbrood vitus/ PCR/ Yoo et al., 2012.
	SBV-Semi-136R	gaa tca agg ggt ggg tgt tc		

아. LAMP법을 사용하는 꿀벌질병의 detection

(1) 개요.

보다 간단히 꿀벌질병의 특이 유전자 검출을 위하여 각 병원체에 대한 4개의 specific primer 를 이용하는 LAMP법(Loop-mediated isothermal amplification)을 사용한다. LAMP법은 등온의 조건에서 특이 유전자의 증폭여부로 병원체의 존재여부를 판정하는 방법이다.

이 LAMP법은 필요 기기로써, 60℃~65℃를 30분 정도 유지할 수 있는 항온기만이 필요하며, 이 이유로 현장 즉석실험에서 큰 강점을 보이고 있다.

LAMP법도 일반 PCR 및 정량 PCR, 초고속 PCR과 같이, 꿀벌시료로부터 얻어진 DNA시료 및 RNA에서 변환시킨 cDNA시료를 기질로 사용하여, 정량 PCR 및 초고속 PCR과 같이, PCR 증폭과정에서 나타나는 형광의 강도를 통하여 각 병원체 특이 유전자의 증폭여부 판단한다.

현재 LAMP법에 의하여 정량적 결과를 산출하는 연구는 발견되지 않고 있다.

본 연구에서는 이 LAMP법을 현장성을 높이 인식하여, 오지에 존재하는 양봉가의 꿀벌질병에 신속히 대응하고자 꿀벌 질병 전반에 이 LAMP법의 적용을 다양하게 개발하였다.

현재 LAMP법에 의하여 검사가 가능한 꿀벌 질병은, DNA시료로부터 미국부저병(ACFB), 유럽부저병(EFB), 백목병(*Ascosphaera apis*), 노제마병(*Nosema cerana*) 등 4종의 병원체이며, 또한 꿀벌 바이러스질병은 RNA시료로부터 변환시킨 cDNA시료를 기질로 4종, 즉 낭충봉아부패병(SBV), Kakugo Virus (KV), 이스라엘 급성마비병(IAPV; Israel acute paralyti virus) 그리고 만성꿀벌마비병(CBPV)을 진단할 수 있어, 총 8종의 꿀벌 병원체를 진단할 수 있다.

(2) 진단용 LAMP의 조성 및 조건

LAMP법에서 기본 조건은 각 primer의 조건에 따라 55°C~65°C의 반응조건으로 *Bst* DNA polymerase가 작용하게 하는 것이다. 보통 이 효소는 80°C 이상이 되면 불활성화 되기 때문에, 94°C에서 5분간 시료인 DNA를 해리시킨 뒤 바로 얼음으로 옮겨 온도를 내린 뒤 나머지 LAMP성분들을 첨가한다. *Bst* DNA polymerase의 작용은 30분-60분간 DNA 신장을 시키고, 80°C에서 10분간 반응을 종료시킨다.

표 1. 꿀벌 병원체 검색용 LAMP의 조성

Template(chromosomal DNA 및 cDNA)	1.0 μ l
Inner-primer1 (20pmole)	1.0 μ l
Inner-primer2 (20pmole)	1.0 μ l
Outer-primer1 (5pmole)	1.0 μ l
Outer-primer2 (5pmole)	1.0 μ l
dNTP (2.5mM each)	1.0 μ l
10 \times Reaction buffer(with 15mM MgCl ₂)	2.5 μ l
<i>Bst</i> DNA polymerase (NEB, U.S.A) (4U/ μ l)	1.0 μ l
D.W	10.5 μ l
Total volume	25.0 μ l

(3) LAMP결과의 판정

LAMP결과의 판정은 기본적으로 전기영동을 수행하여 판정할 수 있으나, 현장실험에 쉽게 적용시킬 수 있도록 판정의 시각화를 추구하였다. 병원체 특이 유전자의 증폭여부는 Cyber Green 또는 GeneFinderTM Nucleic acid fluorescent dye (Baygene Biotech Company Limited, China) 등의 형광물질 첨가로 쉽게 판정할 수 있으며, 이는 전기영동의 결과와 동일하였다 (그림1)

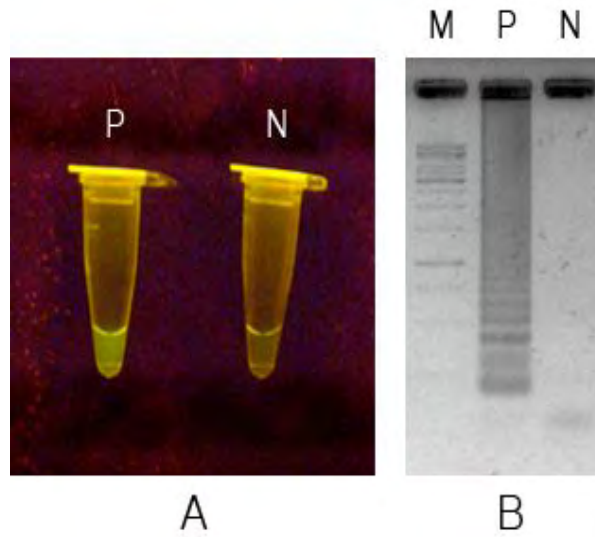


Figure 1. SybrGreen test of *N. ceranae*-specific LAMP.

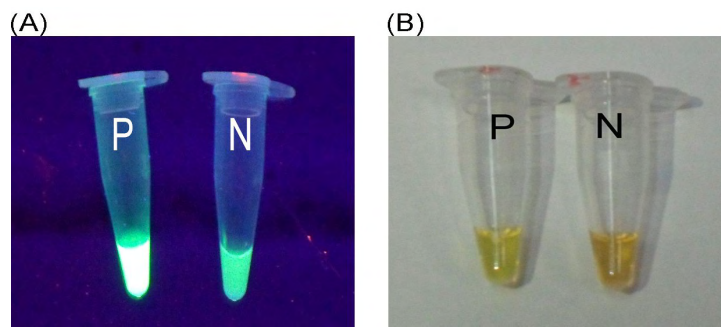


Figure 2. GeneFinder test of KV-LAMP.

자. LAMP detection용 primer들

(1) AFB-검출을 위한 LAMP Primer들의 염기서열

P. larvae 의 metalloprotease (Mtp) gene을 Target 유전자로 삼아 제작하였다.

Table 1. Primers of the molecular cloning and the LAMP-detection for *P. larvae*

	Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	F	AA GGATCC ACTCACGGAGCTACAGAACA
	B	AC GTTCGAC CGAAGGTCCTTTGTAACGAT
LAMP	F3	ACTCACGGAGCTACAGAACA
	B3	CCGAAGGTCCTTTGTAACGA
	FIP (F1c+HindIII+ F2)	TGCCTTTGATCGCATTGCCGA aagctt TATGAGAACGAA TCCGGAGCA
	BIP (B1c+HindIII+ B2)	CGCCGAATAT TCCGGAGGATGC aagctt CCGGCTGACCA TAAAGTGTT

	F3		F2	
103	ACTCACGGAGCTACAGAACA	TACGGCCAAATTTGGAAT	TATGAGAACGAATCCGGAGCATTG	162
3'	TGAGTGCCTCGATGTCTTGATGCC	GGTTAAACCTTATACTC	TTGCTTAGGCCTCGTAAC	162
5'	AATGAATCCATTTCCGATATTATCGGCAATGCGATCAAAGGC	AAAGGATGGCTTATTGGA		222
3'	TTACTTAGGTAAAGCCTATAAT	AGCCGTTACGCTAGTTTCCGTTT	CCTACCGAATAACCT	222
		F1c		
		B1c		
5'	GAAGACGTGTATACGCCGAATATTCCGGAGGATGCTCTCCGTTCC	TAGAGGACCCAACA		282
3'	CTTCTGCACATATGCGGCTTATAAGGCCTCTACGAGAGGCAAGGAATCTCCTGGGTTGT			282
5'	CTTTATGGTCAGCCGGACCATTACAGCAATCGTTACAAAGGACCTTCGG			331
3'	GAAATACCAGTCGGCCTGGTAATGTCGTTAGCAATGTTTCTGGAAGCC			331
	B2		B3	

(2) EFB-검출을 위한 Primer들의 염기서열

based on DNA gyrase subunit B gene

Table 1. Primers of the molecular cloning and the LAMP-detection for *M. plutonius*

	Primer name	Sequence (5'-3')
Cloning	F	CCCGTCGACATGTTTCAAGCTATTTTGCC
	B	ACGTTCAAGGATCCATGGTCGTCTCCAC
LAMP	F3	CGCCCAATTGTTGAAGCT
	B3	CGTCTCCACAATTGATGA
	FIP (F1c+EcoRI+F2)	TCCCCGGCTGAACATAAGTAATATT gaattc TGTTTATATTGCCCAACCAC
	BIP (B1c+EcoRI+B2)	ATTCATTTGATGGAACTTTGCCA gaattc TAATCCCTTGATCGTTGAAC

(3) *Nosema ceranae* 검출을 위한 Primer들의 염기서열

N. ceranae 의 16S small subunit (SSU) rRNA (GenBank, DQ486027)를 target

Table 1. Primers of *N. ceranae*-specific LAMP.

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
Nosema-F3	CTACGTTAAAGTGTAGATAAGATGT	25
Nosema-B3	TCCCATAACTGCCTCAGAT	19
Nosema-FIP ¹⁾	ACCCGTCACAGCCTTGTTAA-TTTT-GTAAGAGTGAGACC TATCAGC	45
Nosema-BIP ²⁾	ACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAG-TTTT-CCATAGGTC AAGTTTCGCC	48

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

5'-TAGACGCTATTCCCTAAGATTAACCCATGCATGTTTTTGACATTTGAAAAATGGA
CTGCTCAGTAATACTCACTTTATTTTATGTAAATTTTAAATTAACTACGTTAAAGTG
TAGATAAGATGTTTACAGTAAGAGTGAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGC
TTAACAAGGCTGTGACGGGTAACGGTATACTTTGTAATATTCCGGAGAAGGAGCCT
GAGAGACGGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGCGAAACTTGACCTATGGATT
TTATCTGAGGCAGTTATGGGAAGTAATATTATATTGTTTCATATTTTAAAAGTATAT
GAGGTGATTAATTGGAGGGCAAATCAAGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACTTGTTTC-3'

Figure 1. Nucleotide sequences and location of primers for *N. ceranae*-specific LAMP.

(4) *Ascospaera apis* 검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열

A. apis 18S ribosomal RNA gene (GenBank, M83264.1)를 target

Table 1. Primers of *A.apis*-LAMP.

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
<i>A.apis</i> -F3	GCCGATGGAAGTTTGAGGC	19
<i>A.apis</i> -B3	ACAAGCTGATGACTTGCGC	19
<i>A.apis</i> -FIP ¹⁾	TTGGCCCTGTCATGTGAGGC-TTTT-ACAGGTCTGTGATG CCCTTA	44
<i>A.apis</i> -BIP ²⁾	TGTTAAACCCTGTCGTGCTGGG-TTTT-AGGCATTCCTCG TTGAAGAG	46

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

5'-GACGTTTGTCGGCTGCTGGCTTCTTAGAGGGACTATCGGTTCTTAAGCCGATGGA
A. apis-F3
A. apis-F2
 AGTTTGAGGCAATAACTGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCGC
 (sense)
 A. apis-F1(loop)
 TACTACTGACAGGGCCAACGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTCTGGGTAATCTTGT
A. apis-B1(loop)
 TAAACCCTGTCGTCTGGGGATAGACATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAGGAATGCC
A. apis-B2(anti-sense)
A. apis-B3
 TAGTAGGCGCAAGTCATC-3'

Fig. 2. Nucleotide sequences and location of primers for *A. apis*-LAMP.

(5) CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus) 검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열

Table 1. Specific primers for CBPV-LAMP

name	sequence (5'→3')	reference
CBPV_LAMP_F3	CATCAAACGGGAGTCCGG	This study
CBPV_LAMP_B3	ATCAAGGCGTACTTGCGG	This study
CBPV_LAMP_FIP	TGCACCCTCTTCAACCAACTCA-TTTT -GACTACTCCGTTACGCCAAT	This study
CBPV_LAMP_BIP	AACGCTACCCAGAATGGCGTC-TTTT -GTTCTGGGTCGCTGAGGA	This study

TCAGACACCGAATCTGATTATTGTGAAGCCCAAACCTGGAAGTCATCCGTAGA
TCTGGCTCTAACGCCGTTTGCAGCCCTCTCTCGTACTGGAGACGAGAGAGGA
CGGGACCAAGCTCATCCACCTACCAGTACAACATACCCCTCTCGCAGTCCCAGT
CAACCTTGCCAGATTTATTACCACCGAAGCGGTTCAAGAGATCTCAGACCAACT
CCTGCGCGTCCCACCCGATAACATCGAGAGGTGCCGACACATACTTCACTCTCT
CATCAAACGGGAGTCCGGATCCCCGAGACACTCCGTTACGCCAATTCGTCGAA
CBPV_LAMP_F3 CBPV_LAMP_FIP
GAATTCTTAACGACGCCTCAGATGAGTTGGTTGAAGAGGGTGCAATCCCCTGTA
CBPV_LAMP_FIP
GATTTCTCGATATGGATCAAACGCTACCCAGAATGGCGTCAACGGCAGCTCATC
CBPV_LAMP_BIP
GCCGCACGAAATCGCGCCTCAGCGACCCAGAACCTCGCCGCAAGTACGCCTT
CBPV_LAMP_BIP CBPV_LAMP_B3
GATAAAGAACTTTGTCAAGAACGAGACCACCGCCAAGTTCGTGGATCCAAGAA
ACATCAGTCCACGAAGCGACGAGTTTCTAGTAGT

Figure 1. Sequences and locations of four primers for CBPV-LAMP

(6) SBV 검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열

Table 1. Information of SBV-LAMP primer set.

Oligo	Sequence (5'→3')	Length (mer)
SBV-F3	CGCGAATGATGTCATCTGT	19
SBV-B3	ATCTTCCAACGCACCAC	18
SBV-FIP ¹⁾	CAATAGGTCTTTGAGAACGGGATAATTTTCGATTATTCAC AACAGGGAG	49
SBV-BIP ²⁾	GCGAAGGATCTTGTGGAGAAGGTTTTGTTGGGACTTCAGT GCTAA	45

1) FIP : combine by F1c and F2

2) BIP : combine by B1c and B2

5'-CGGTATTTTACGCGAATGATGTCATCTGTTACGATTATTCACAACAGGGAGCTTG
SBV-F3 SBV-F2(sense)
TGGATCCTTGTGCTTTTTATCCCGTCTCAAAGACCTATTGTGGGAATGCATTTTGC
SBV-F1(loop)
TGGTCGGGGCGAAGGATCTTGTGGAGAAGGTTATGGAGTTATTTGACTAAAGAGGC
SBV-B1(loop)
CATTGGGGATATTTTAGCACTGAAGTCCCAACCTGTGGTGCAGTTGGAAGATTGG-3'
SBV-B2(anti-sense) SBV-B3

Fig. 1. Nucleotide sequences and location of primers for SBV-LAMP.

(7) IAPV검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열

Table 1. The four specific primers for IAPV-RT-LAMP

name	Sequence (5'→3')	mer	Tm (°C)
IAPV-VP2-F3	GTTATAGGATTACCGTGGTGA	21	56
IAPV-VP2-B3	GAACACGTATTGTAACCTTCTGT	22	56
IAPV-VP2-FIP	TGACGGGTATCACTCCTGGTTTTAGACAGCTTTTCATACT GGC	44	59
IAPV-VP2-BIP	CATTGGGCCCGATCAGGATCTTTTAGTCAGGTCCAAAATGT ACT	44	58

ATGATTGGGGCGGTGTAATACCAGTGGGAATGCCTTGTTATTCTAAATCCATT
 AGAACTACAAGTATTTTCAGAAACGGAAAATCGTGAAACTGAAGTCATAGAT
 GCCGCTCCATGTGAATATGTTGCTAACATGTTCTCGTATTGGCGTGCAACTAT
 GTGTTATAGGATTACCGTGGTGAAGACAGCTTTTCATACTGGCAGACTTGA
 IAPV-VP2_F3 IAPV-VP2-FIP
 GATTTTCTTTGAACCAGGAGTGATACCCGTCAAACCCACTGCAAATAACCATT
 IAPV-VP2-FIP
GGGCCCGATCAGGATCAACTCACAGGAGCGGTGGCTCCTTCCGATAATAAC
 IAPV-VP2-BIP
 TATAAGTACATTTTGGACCTGACTAAATGATACAGAAGTTACAATACGTGTTCC
 IAPV-VP2-BIP IAPV-VP2-B3
 TTTTGTTCAAATAAGATGTTCCCTTAAGACTGCTGGAATCTATGGTGCTAATA
 GTGAAAATAACTGGAACCTTT//CATGAATCCTTTACTGGATTCTTGTGTATAA
 GACCAGTCACTAAATTGATGGCTCCTGATACTGTGTCTGACAATGTATCTATA
 GTTGTGGGAAATGGGCAGAAGACGTA

Figure 1. Sequences and locations of four primers for IAPV-RT-LAMP.

The six locations of motifs for primers and loops for the LAMP are denoted underlines.

(8) KV검출을 위한 LAMP-primer들의 염기서열

Table 1. Information of KV-LAMP(s) primer set

Oligo	Sequence(5'→3')	Length (mer)
KV-F3(2)	TTAACGCTGAGCATGGTA	18
KV-B3(2)	ACTCGCTTCATTTTCGTCTT	19
KB-FIP(2) ¹⁾	TGAGTGCCATACTTTGACAACTTTTTTATTGATGTTAACAGCT TAGAATGG	52
KB-BIP(2) ¹⁾	TAAGAATTTTGGCCCTGGATTAGATTTTATAGTATAATGTAATAC CCAGTCGA	52

¹⁾FIP : combine by F1c and F2

²⁾BIP : combine by B1c and B2

5'-GCCTTAACGCTGAGCATGGTATAGGTATTGATGTTAACAGCTTAGAA
KV-F3(2) KV-F2(2)(sense)
TGGACAAATTTGGCAACAAGTTTGTCAAAGTATGGCACTCATATCGTGA
KV-F1(2)(loop)
CGGGTGACTATAAGAATTTTGGCCCTGGATTAGATTCCGATGTTGCAGC
KV-B1(2)(loop)
TTCGGCGTTCGAAATTATTATCGACTGGGTATTACATTATACTGAAGA
KV-B2(2)(anti-sense)
AGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGT-3'
KV-B3(2)

Figure 1. Nucleotide sequences and location of primers for KV-LAMP(s).

3. 특이 항체에 의한 꿀벌병원체의 검색

가. Immunochromatography법에 의한 검사

본 연구에 의하여 다수의 Immunochromatography법에 의한 꿀벌질병 검사법이 개발되었다. 면역크로마토그래피법은 병원체의 특이항원에 대한 특이항체를 사용하여, 해당 병원체가 시료내에 존재함을 시각적으로 볼 수 있게 고안된 것이다. 본 항은 미국부저병의 진단을 위한 면역크로마토그래피 키트의 사용설명서를 위한 원안이기때문에, 검사 비전문가를 위하여 매우 미세한 부분까지 친절하고 자세히 기술하였다.

(1) 기본 설명 및 제품의 구성

꿀벌의 미국부저병(AFB) 검출을 위한 면역학적 신속검사 키트(Immunochromatographic rapid test: IC-PF-01)는 미국부저병(American Foulbrood; AFB)의 병원체인 *Paenibacillus larvae*에 대한 면역학적 신속검출법 키트로써, *Paenibacillus larvae*의 편모항원(flagella antigen) 또는 포자 항원 (Spore-antigen; IC-PS-01)을 시각적으로 검출할 수 있게 개발된 것이다. 이는 양봉현장과 양봉질병검사실 모두에서 쉽게 사용할 수 있도록 하였다.

제품의 구성은 1) Plastic cassette (검사의 플라스틱 본체), 2) 용출용 완충액 (glass bead와 buffer가 포함된 tube, 용량 0.8 ml), 3) 미니 분쇄기 (tube에 내부에 꼭 맞게 제조된 플라스틱 막자), 4) 1.5 ml용 원심분리용 튜브, 5) 미니 스포이드, 6) 사용설명서 등으로 하였다.

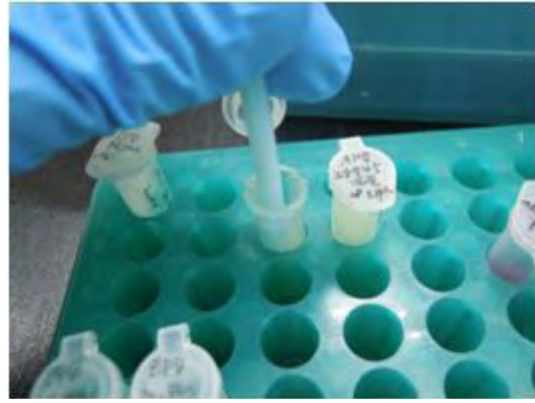
(2) 검사의 순서 및 판정

(가). 시료분쇄 및 용출

검사하고자 하는 꿀벌의 애벌레(또는 성충)를 1.5 ml용 원심분리용 튜브에 넣고, 미니 스포이드를 사용하여 용출용 완충액을 0.2 ml(시료와 동량) 가한다. 용출용 완충액에는 작은 glass bead가 혼합되어 있기에, 완충액 튜브를 사용 전에 흔들어서 잘 혼합하여 주고 즉시 용출액을 시료쪽으로 옮겨 주어야 한다. 검체의 양은 0.2 ml를 기준으로 하였으며, 이는 보통 꿀벌 성충 1마리에 해당되고, 애벌레의 경우 그 크기에 따라 몇 마리를 모아서 사용한다. 성충의 경우 쉬운 분쇄를 위하여 날개를 제거하는 것이 유리하며, 실험 목적에 따라 머리 또는 가슴부분만 몇 마리 것을 모아 함께 분쇄하면 검출 확률을 높일 수 있다.

(나) 2. 미니분쇄기를 사용하여, 검체를 분쇄한다.

미니분쇄기는 1.5 ml용 원심분리용 튜브의 바닥에 꼭 맞도록 제작되어 있으며, 용출액내에는 작은 glass bead가 포함되어 있기에, 미니분쇄기로 튜브 바닥을 누르고 또는 돌리면서 분쇄한다. 분쇄시간은 약 30초 수준으로, 육안으로 보이는 덩어리가 없는 정도까지 이다. 용출액이 튜브밖으로 나오지 않도록 주의한다.

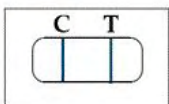


(다). 미니분쇄기 또는 미니 스포이드를 사용하여, 용출액 수 방울을 본체(cassette)의 시료투입구(S)에 투입한다. 미니분쇄기는 끝이 큰 원추형으로 되어있어, 큰 방울을 일시적으로 옮겨줄 수 있다. 분쇄된 용출액에 분쇄기 끝을 잠기게 하였다가 바로 본체 시료투입구위에 분쇄기 끝을 위치시키면 큰 방울로 떨어지게 된다. 시료투입구는 본체에 S (sample)로 표시된 부분이며, 타원형이고 바닥에 흰색의 filter가 보인다. 양은 크게 1방울이며 또는 작게 2-3방울이며, 부피로는 0.1 ml 내외이다.

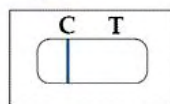
(라). 본체(cassette)가 수평이 되게 두고 C선에 붉은 선이 형성되기를 기다린다. 본체의 plastic부분에 직사각형의 홈이 있고, 그 변에 “T”, “C”가 양각으로 표시되어 있으며, 홈의 바닥에 흰색의 filter가 노출되어 있다. 투입된 용출액은 T (Test)선을 지나 C (Control)선에 이를 것이며, C선에서는 검사결과가 양성/음성에 관계없이 붉은 선이 형성되어야 한다.

(마). 결과의 판독: C선과 T선 모두에 붉은 선이 형성되면 양성으로 판정. T선과 C선 모두에서 붉은 선이 나타나면 “양성”, 즉 *Paenibacillus larvae*의 편모항원이 검체 내에 있다는 것이며, 미국부저병의 원인균이 시료내에 존재한다는 결과이다. C선에는 붉은 선이 나타났으나, T선은 변화가 없거나 매우 미약하다면 “음성”으로 판정한다. T선의 결과가 애매한 수준이면 “의양성”으로 판정할 수 있다. 단, C선은 검사결과가 양성이나 음성이나 붉은 선이 형성되어야 한다. T선에 붉은 색이 나타나지 않는다면 그 결과는 “판정불능”으로 하여야 한다.

Positive



Negative



(3) 키트의 원리

본 키트는 sandwich-type lateral flow assay로써, *P. larvae*의 편모항원과 특이적으로 결합하는 단클론항체 (*P. larvae* 특이 단항체; detector)와 colloidal gold가 결합된 conjugate를 시료

투입구 아래의 위치시키었고, 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)를 T (test) 선에 위치하게 하였다. 한편, 모든 항체(IgG)와 결합할 수 있는 항체를 C (control)선에 위치하게 하였다.

따라서, 검체(용출액)가 투입되면, 투입구 아래 쪽에 위치한 *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은, 투입된 검체 중의 *P. larvae* 편모항원과 특이적 결합을 하게 되어 편모항원-항체-colloidal gold complex를 만들게 된다. 이 complex들은 모세관현상으로 nitrocellulose membran위를 이동하게 되며, 이 과정에서 T (test) 선에 위치한 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)에 편모항원-항체-colloidal gold complex 중의 편모항원이 결합됨에 따라, 편모항원-항체-colloidal gold complex는 T-선상에 축적되게 되게 된다. 이 축적된 complex중의 colloidal gold들은 시각적으로 T선이 붉은 선으로 보이게 하며, 양성판정을 하게 한다.

한편, 검체 중에 병원균인 *P. larvae*가 없을 경우, 당연히 *P. larvae* 특이 편모항원도 없기에, 투입구 아래 쪽에 위치한 *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은, 그대로 모세관현상으로 nitrocellulose membran위를 이동하게 되며, 이 과정에서 T (test) 선에 위치한 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)와 반응함이 없이 C선 쪽으로 이동하게 된다. C선에 이르면 모든 항체(IgG)와 결합할 수 있는 항체가 C (control)선에 위치하고 있기에, *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은 C선에 축적되게 되며, 역시 colloidal gold에 의하여 붉은 선으로 보이게 된다.

나. Immunochromatography법에 의해 검사가 가능한 병원체의 종들

- (1) 미국부저병(AFB) 진단용 rapid kit; *Paenibacillus larvae* spore 검출용 immunochromatography (IC-PS-01)
- (2) 유럽부저병(EFB) 진단용 rapid kit; *Melissococcus plutonius* 검출 immunochromatography (IC-MP-01)
- (3) 날개불구병(DWV) 진단용 rapid kit; Deformed Wing Virus 검출 immunochromatography (IC-DWV-01)
- (4) 낭충병(SBV) 진단용 rapid kit; Sac Brood Virus 검출 immunochromatography (IC-SBV-01)
- (5) 만성마비병(CBPV) 진단용 rapid kit; Chronic Bee Paralysis Virus 검출 immunochromatography (IC-CBPV-01)
- (6) 이스라엘 급성마비병(IAPV) 진단용 rapid kit; Israeli acute Paralysis Virus 검출 immunochromatography (IC-IAPV-01)

(7) 흑색여왕벌병(BQCV) 진단용 rapid kit; Black Queen Cell Virus 검출 immunochromatography (IC-BQCV-01)

- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 13 절 꿀벌 질병의 진단에 따른 표준 처방

1. 꿀벌의 감염성 질병 치료를 위한 꿀벌응애 구충법들

가. 개요

꿀벌 질병은 크게 기생성 질병과 감염성 질병으로 나누어 질 수 있다. 꿀벌의 기생성 질병의 주범은 꿀벌응애(Varroa)와 진드기류이며, 이 중 꿀벌응애는 계속 잔류되는 대표적인 꿀벌 기생충으로, 거미류에 속하며, 거의 전 세계의 양봉현장에 분포되어 피해를 야기시키고 있다. 국내의 양봉에서도 꿀벌응애의 피해는 상당히 심한 수준이며, 거의 모든 양봉장에서 꿀벌응애에 대한 구충약을 다소간 사용하고 있다.

꿀벌응애는 기생성 질병의 원인체이나, 본 과제의 범위인 감염성 질병들과 상당히 깊은 연관을 가지고 있다. 우선 많은 바이러스 질병의 매개체가 바로 꿀벌응애이며, 바이러스질병의 퇴치를 위하여 꿀벌응애의 구축이 필수적일 정도이다. 사실 꿀벌응애만 봉군에서 제거되어도 바이러스의 감염수준은 크게 떨어지며, 이는 매개체의 제거뿐 아니라, 꿀벌응애의 창궐에 의한 꿀벌들의 체력 감소, 또는 면역력 감소가 해소되기 때문으로 해석된다. 따라서 바이러스감염으로 진단이 되었을 경우, 꿀벌응애의 구축이 적극 추천된다. 이 이유로 본 과제의 범위를 넘어서나, 꿀벌응애의 구축법을 다음과 같이 수록한다.

표 1. 벌꿀의 동물약품 잔류기준 (식품의약품안전청 고시)

약품명	잔류기준
옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)	0.3 mg/kg
클로람페니콜(Chloramphenicol)	불검출
네오마이신(Neomycin)	0.1 mg/kg
스트렙토마이신(Streptomycin)	불검출
아미트라즈(Amitraz)	0.2 mg/kg
코마포스(Coumaphos)	0.1 mg/kg
플루바리네이트(Fluvalinate)	0.05 mg/kg
플루메쓰린(Flumethrin)	0.01 mg/kg

꿀벌질병의 제어를 위하여 제일 먼저 추천되는 바는, 우수한 사양관리에 의한 예방, 그리고 발병이 되었을 경우에도 우수한 사양관리에 의한 극복이 우선이라는 것이다. 부득이 한 경우, 적정 약제를 적정 용법으로 투약하여 극복할 수 있을 것이며, 약제 투입의 경우에도 친환경 생물학적 제제의 사용이 적극 권장되며, 부득이 화학약품을 사용할 경우 식품인 벌꿀에 처리된 약

제가 잔류하지 않도록 주의하는 것이 매우 중요하다.

나. 꿀벌응애의 구축을 위한 친환경 생물학적 처치법

(1) 젖산(Lactic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축

(가) 용법 및 용량

- 1) 15%의 젖산을 사용하여 소비 한 장 당 3-6 ml의 비율로 분무한다.
- 2) 5일 간격으로 2회 이상 처리하면 40-95%의 방제 효과를 기대할 수 있다.

(나) 제법 및 주의점

- 1) 일반적인 공업용 젖산(Lactic acid)는 85%의 농도로 판매되며, 820 ml 수도물에 180 ml 85% 젖산(Lactic acid)을 가하여, 15% 젖산용액 1000 ml를 만들어 사용한다.
- 2) 85% 젖산(Lactic acid)은 매우 독성이 강하기에, 보관에 주의하여야 하며, 취급에서 고무장갑의 착용은 필수적이고, 피부에 접촉시 즉시 다량의 물로 세척하여야 한다.
- 3) 봉충이 없는 이른 봄에 처리하는 것이 유리하며, 봉충에 직접 분무하면, egg와 larvae는 상해를 입을 수 있음에 유의한다.
- 4) 과다 용량의 사용, 영하의 날씨에서 젖산을 처리하면 봉군의 피해가 커질 수 있다.
- 5) 이는 유럽의 여러 국가에서 20년 이상 꿀벌응애 공식 구제약으로 사용된 신뢰성이 있다.

(2) 개미산(Formic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축

(가) 용법 및 용량

- 1) 60%의 개미산을 사용하여, 가급적 전용 개미산 기화기로 기화량을 조정한다
- 2) 5일간 처치를 계속하면 구축효과를 높일 수 있다.

(나) 제법 및 주의점

- 1) 일반적인 공업용 개미산(Formic acid)는 85%의 농도로 판매되며, 540 ml 85% 개미산(Formic acid)에 180 ml 수도물을 가하여, 60% 개미산 용액 720 ml를 만들어 사용한다.
- 2) 개미산(Formic acid)은 매우 독성이 강하기에, 보관에 주의하여야 하며, 취급에서 고무장갑의 착용은 필수적이고, 피부에 접촉시 즉시 다량의 물로 세척하여야 한다.
- 3) 봉충이 없는 이른 봄에 처리하는 것이 유리하나, 기화된 개미산은 봉개된 소방안에까지 침투되어 방제효과를 보일 수 있기에, 동절기를 제외한 모든 계절에 사용이 가능하다. 단, 온도는 통풍상태, 봉군의 대소와 함께 개미산 기화에 큰 변화를 줄 수 있는 요소이기에, 기온에 따라 기화량의 조절이 성패의 관건이다. 일반적 사용가능 기온은 18°C-28°C이며, 30°C이상에서는 사

용하지 않는 것이 유리하다.

- 4) 기화량의 조절은 개미산 전용 기화기의 사용설명에 따라서 하며, 일반적 용량은, 단상 10매 소상의 경우(소문의 폭 2 cm), 전용 기화기의 기화면적을 9 cm x 4 cm 기준으로, 120ml 60% 개미산을 고르게 흡수시켜 소상 내 5일간 기화시킨다. 계상의 경우, 기화면적과 60%개미산 투여량을 약 10% 수준으로 증가시켜 5일간 처리한다
- 5) 개미산 사용에서 낙봉 및 기는 벌의 발생은 자주 관찰되며, 감내할 수준이라면 처치를 계속 할 수 있으나, 감내할 수준을 넘어서면 즉시 기화기를 제거하고 통풍을 강화시켜 주어야 한다. 소상내 기화된 개미산의 농도가 낮으면, 낙봉 등이 나타나지 않으나, 꿀벌응애의 구제효과가 떨어지는 것은 자명한 것이다. 따라서, 소상의 바닥에 일부라도 시트지(접착지)를 깔아주어 꿀벌응애의 구제효과를 반드시 확인하면서 처치를 하여야 할 것이며, 봉장내 모든 봉군에게 일률적으로 처치하는 것 보다는, 일부 봉군에 처치해 보고, 그 효과를 참고하여 기화량을 조절한 후 전체 봉군에 적용하는 조심성이 필요하다.
- 6) 장마기간이나 당액의 공급기간에는 습도가 높아져 기화된 개미산의 산도가 저하되기에 방제효과도 저하된다.
- 7) 15일 이상 장기간 기화기를 사용하거나, 과다 용량, 높은 기온 등은 산란 중지를 야기할 수 있기에 주의한다.
- 8) 이는 유럽의 여러 국가에서 사용되는 신뢰성이 있으나, 개미산 기화의 농도조절 실패 등 처치법의 미숙으로 인한 많은 피해사례가 보고되었다.

(3) 옥살산(Oxalic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축

(가) 용법 및 용량

- 1) 3.2%의 옥살산당액을 사용하여, 강군은 5 ml, 약군은 3 ml를 소상 내벽 (소비 사이)에 흘러 넣어 준다.
- 2) 봉관이 없는 이른 봄 또는 늦은 가을에 사용하며, 기온이 5°C 이상일때 처리한다.

(나) 제법 및 주의점

- 1) 일반적인 공업용 옥살산은 흰색 또는 무색의 결정체이다. 3.2% 옥살산 당액은 물 1 liter에, 설탕 1 kg, 옥살산 75 gram을 녹여서 제조한다.
- 2) 옥살산은 매우 독성이 강하기에, 보관에 주의하여야 하며, 취급에서 고무장갑의 착용은 필수적이고, 피부에 접촉, 분말의 흡입에 주의하여야 한다.
- 3) 옥살산 사용에서 낙봉 및 기는 벌의 발생은 자주 관찰되며, 감내할 수준이라면 처치를 계속할 수 있으나, 감내할 수준을 넘어서면 처치액을 소상내에서 즉시 제거하고 통풍을 강화시켜 주어야 한다.
- 4) 소상내 기화된 옥살산의 농도가 낮으면, 낙봉 등이 나타나지 않으나, 꿀벌응애의 구제효과가 떨어지는 것은 자명한 것이다. 따라서, 소상의 바닥에 일부라도 시트지(접착지)를 깔아주어 꿀벌응애의 구제효과를 반드시 확인하면서 처치를 하여야 할 것이며, 봉장내 모든 봉군에게 일률적으로 처치하는 것 보다는, 일부 봉군에 처치해 보고, 그 효과를 참고하여 3.2% 옥살산당액

의 양을 조절한 후 전체 봉군에 적용하는 조심성이 필요하다.

5) 반복적 옥살산의 투여는 여왕벌을 죽이는 수가 있기에, 2회/년(이른 봄, 늦가을)이하로 처치를 제한한다.

(4) 티몰(Thymol)을 사용한 꿀벌응애의 구축

Thymol은 Thymian oil의 주성분으로 천연재료에서 추출되었으나, 꿀벌응애 방제제로 사용되고 있는 것은 합성 Thymol로써, 과연 친환경제제인가 하는 것은 아직 판정되지 않았다. 그러나, Tymol제제는 1 liter의 공기 당 5-15 ug의 농도에서 꿀벌응애 방제효과를 보이고 있으며, 잔류성과 내성이 없는 장점으로 유럽제국에서 다년간 사용되어 왔다.

Thymol 제품들은 모두 기온이 15°C 이상일때 처리할 수 있도록 제작되었으며, 용법이 간단하고, 현재까지 특별한 문제가 보고되지 않아 호평을 받고 있다(단, 봉장의 일부 봉군에 투여하였을 경우 도봉이 발생되고, 과다 사용에서는 봉군전체의 도주가 발생되었다는 보고가 있음).

표 2. Thymol 성분의 꿀벌응애 구제제품들

약품명	성상	제조국/제조사
Thymovar (티모바)	스트립	스위스/BioControl
Apiguard (아피가드)	젤	프랑스/
Apilife Var (아피라이프)	스트립	이탈리아
메파티카	용액	

(5) 비넨볼(Bienewohl)을 사용한 꿀벌응애의 구축

BienenWohl은 식물성 Flavinoid(프라비노이드)를 주성분으로 하는 꿀벌응애 구제제이다.

Flavinoid는 원래 나무껍질 등에서 채취되는 황색 색소 성분으로, 염료, 창상방부제, 해충구제제로 사용되어 왔으며, 1987년 독일의 Dr. Deny가 propolis와 citric acid를 혼합하여 BienenWohl제조하고 꿀벌응애 구제제로 상품화 하였다. 방제의 기능은 Flavinoid향이 꿀벌응애의 감각기관에 작용된다고 주장되고 있으며, 꿀벌응애 방제효과외에 꿀벌의 청소욕구를 자극하여 석고병의 방제와 산란촉진에도 효과가 있다고 하나, 보다 정확한 기작은 연구를 필요로 할 것이다.

용량과 용법은 Bienenwohl 용액 1ml 씩을 각 소비사이에 흘려 넣어주는 간단한 것이며, 월동 직전 봉판이 없는 봉군에 5°C 이상의 기온에서만 사용한다. 이 용법을 지키는 조건에서 특별한 부작용은 보고된 바 없다.

다. 꿀벌응애의 구축을 위한 약품들

꿀벌응애를 방제하기 위한 약품은 그 잔류성과 부작용을 우려하고 있으나, 간편함과 즉효성 때문에 현재 가장 많이 사용되고 있다. 약품명 및 주성분 등을 중심으로 다음과 같이 표로 작성하였다.

표 3. 국내에서 입수가 가능한 꿀벌응애의 구제제들

제품명	/제조사	주성분명	성상	잔류기준/ 벌꿀
피투	/대성	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
피투	/중앙	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
피투	/한동	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
왕스	/중국	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
만패	/중국	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
속살만2호	/중국	플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
마부리크		플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
아피스탄		플루바리네이트(Fluvalinate)	스트립	0.05 mg/kg
바이바를	/독일	플루메쓰린(Flumethrin)	스트립	0.01 mg/kg
바로카트		아미트라즈(Amitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
마이카트		아미트라즈(Amitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
마이탁		아미트라즈(Amitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
속살만		아미트라즈(Amitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
페리진		코마포스(Coumaphos)	액체	0.1 mg/kg
체크마이트		코마포스(Coumaphos)	액체	0.1 mg/kg
폴백스-VA		Bromopropylate	훈연지	-*
바로킬P(Varokil P)		시미아졸(Cymiazole)	분말	-*
아피톨		시미아졸(Cymiazole)	분말	-*
신등전훈연지		Tetradifon	훈연지	-*
다카라		Chlorobenzylate	훈연지	-*
진멸지		Chlorobenzylate	훈연지	-*

* 조사되지 않았다는 뜻이며, 잔류기준이 없다는 것이 아님.

2. 미국부저병(afb), 유럽부저병(efb)에 대한 항생제 처치

가. 테트라사이클린에 의한 세균성 질병의 처치

옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)이 항생제의 이름이며, 약품으로의 성분은 옥시테트라사이클린 HCl (Oxytetracycline Cl)로 기재되어 있다. 테라마이신(Terramycin)은 Prizer사의 상품명이나 보통 대명사처럼 혼용되어 사용되고 있다.

국내 양봉계에 추천되는 항생제는 옥시테트라사이클린, 네오마이신(Neomycin)의 두 종 뿐이며, 그 외의 항생제는 잔류성 때문에 추천되지 않는다. 그러나 옥시테트라사이클린, 네오마이신도 자연적 분해력이 뛰어나 잔류성이 매우 미약하다 할지라도, 식용꿀 생산과정에서 투약은 벌꿀에 잔류가능성을 매우 높이며, 정량을 투여한다 하더라도 채밀 4주이내의 투약은 삼가야 한다.

옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)의 한 봉군 당 사용되는 정량은 주성분의 양으로 200 mg (0.2 gram)이다. 동물용 테라마이신 분말은 약품의 보존제, 감미제 등이 혼합되어 있어, 분말의 무게는 주성분 테트라사이클린의 양보다 10배 이상 많을 수 있기에, 약품에 인쇄되어 있는 주성분의 함량을 기록하고 함량에 따라 계산하여 정량을 투여하여야 한다(예. 동물용 테라마이신 분말의 총량 1 kg 중 옥시테트라사이클린의 양은 50 gram, 또는 주성분은 총 중량의 5%, w/w로 기재되어 있다면, 분말의 총량 1 kg 중 옥시테트라사이클린의 양은 50 g이기에, 봉군 당 1회 투여량인 0.2 g (200mg) 나누면, $50g/0.2g=250$ (봉군), 즉 분말 1kg은 250봉군에 1회 투여할 수 있는 양인 것이다).

한편, 옥시테트라사이클린은 살균제가 아니며, 병원균의 성장을 저지시키는 정균제이기에 1회 투여로는 큰 효과를 보기 힘들며, 3일-5일 간격으로 3회 이상 거듭 투여하여 치료효과를 높여야 할 것이다. 또한, 옥시테트라사이클린은, 같은 이유로 미국부저병균의 포자까지는 죽이지는 못한다. 그러므로 포자를 제거하지 않는 이상 미국부저병은 항상 재발의 가능성이 남아있다.

(1) 분말제의 조제 및 처리

200mg의 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)을 30g 설탕과 혼합하여 1개 봉군에 1회 투여한다. 한편, 많은 봉군에 동시에 투약할 경우, 상기의 비율로 제조하여 잘 혼합한 후, 각기 투여하되, 1봉군 당 1회 200mg의 테라마이신이 투여되도록 한다.

설탕과 혼합된 테라마이신은 소비의 위쪽에 그대로 뿌려주거나, 벌통의 구석에 넣어 두며, 3일 간격을 두고 3-5회에 걸쳐 가급적 새로이 조제하여 투약한다.

(2) 설탕액으로 조제

200mg의 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)을 30ml 물에 완전히 녹인 후 30g의 설탕을 넣

고 설탕사양액으로 조제하며, 1개 봉군에 급여한다. 이는 1개 봉군이 수시간 안에 완전히 소모시키는 양으로, 3일 간격을 두고, 3회-5회, 매번 새로 조제된 것으로 급여한다.

(3) 음용수에 의한 항생제의 투여 방법:

항생제 테트라사이클린은 수용액 또는 설탕액이 되었을 경우 비교적 빠르게 분해되기에, 가급적 분말로 제조하여 처리하는 것이 바람직하다. 부득이, 급수기를 이용하여 수용액으로 투약할 경우 벌에 의한 물의 소비를 충분히 계산하여, 1일 물소비량 이내로, 가급적 소량씩 조제하여 공급하여야 한다. 중앙 음용수통에 약품을 타서 다수의 봉군에 동시 투여하는 경우는, 음용수통을 모두 비우고, 계산된 항생제 용액을 부어주어 모두 소모시킨 후, 다시 음용수를 채워주어야 할 것이다.

(4) 일반적 처리시기 및 조건

이른 봄 또는 가을철에 봉군이 급성장하기 전에 처리하면 발병에 대한 예방효과를 거둘 수 있다. 이 경우 벌꿀이 본격적으로 생산되기 최소 4주전에 처리하여야 생산벌꿀에 항생제 혼입을 막을 수 있다. 또한 과다 공급으로 항생제가 혼합된 설탕이 저장되는 일이 없도록 한다.

(6) 약효 및 지속 기간

옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)은 바로 햇빛에 노출되었을 경우 1일 이내에 상당 부분 파괴되어 약효가 없어질 정도로 비교적 쉽게 분해되는 항생제이므로 항생제 잔류의 위험성이 약한 편이다.

봉군에 개별 급수기를 사용하고, 이를 이용하여 항생제 테트라사이클린을 투약하는 경우, 급수기 내의 항생제가 햇빛에 의해 쉽게 파괴될 수 있는 점을 주의하여야 한다.

또한 과량의 항생제는 잔류 위험, 병원균의 내성을 증가 등을 일으킬 수 있으므로 적정량 및 적정시기의 항생제 사용이 항상 강조된다.

참고로 음지에서 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)의 반감기는 34°C에서 7일, 30°C에서 17일이나, 25°C에서 8주, 4°C에서 13주로써, 한번 개봉된 테트라사이클린은 개봉 시각부터 자체 파괴되는 것으로 계산하여야 한다.

나. 네오테트라에 의한 세균성 질병의 치료

네오테트라(Neotetra)는 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)과 네오마이신(Neomycin)이 혼합되어 있는 상품명으로, 각 제제를 개별적으로 사용하였을 경우에 비해, 그 치료효과가 우수하다. 용법과 용량은 제품설명에 따른다.

다. 소각 처리

옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)의 처치 후에도 봉군 내 미국부저병(AFB)이 계속 확산된다고 판단되는 경우는, 1) 오진이거나, 2) 옥시테트라사이클린 저항성의 *P. larvae*의 감염으로 판단할 수 있다.

오진이 의심되는 경우, 신생의 larvae들을 시료로 다시 진단을 받아 처리할 수 있을 것이며, 옥시테트라사이클린 저항성의 *P. larvae*의 감염으로 판단되는 경우, 식용꿀 생산 및 잔류 위험성을 무릅쓰고 스트렙토마이신, 클로람페니콜 등의 다른 항생제를 사용할 수 있을 것이다. 그러나, 이 경우 항생제의 잔류성을 특히 유념하여야 할 것이며, 사용된 소비, 소상, 벌꿀 등을 별도 관리하여야 한다.

미국부저병(AFB)이 확실하다면, 이 질병의 재발 우려가 워낙 높기에, 지체 없이 소각 처리하여 다른 봉군으로의 전파를 차단하는 것을 경제적 측면에서 충분히 고려하여야 한다. 소각 대상은 오염된 벌통, 꿀, 꿀벌 등 모든 것을 의미한다.

많이 사용되는 방법은, 활동이 없는 일몰 시각에 종이컵 하나 정도의 석유를 밀폐된 소문아래로 흘려보낸 후 완전히 밀봉하고, 모든 꿀벌이 죽은 것을 확인한 후, 벌통을 50cm 깊이의 구덩이로 옮겨 석유를 뿌려 완전히 소각하고, 최소 20cm이상 깊이로 묻어야 한다.

3. 노제마병에 대한 처치

가. Fumagillin(퓨마질린)에 의한 노제마병에 대한 처치

노제마병(Nosema disease; Nosemosis)은 미포자충(Kingdom: Protista, Phylum: Microspora)에 속하는 *Nosema apis* 또는 *Nosema cerana*가 꿀벌의 성충에 감염 기생함으로써 발병하는 내부 기생충성 전염병이다. 일반적으로 *Nosema apis*는 병원성이 심한 것으로 고려되지는 않았으나, 1994년 중국의 토봉에서 유래된 *Nosema cerana* (Fries et al., 1996),가 서양종 꿀벌에서도 큰 피해를 입히는 것으로 나타나 이의 제어가 주목받고 있다.

한편, Fumagillin(퓨마질린)은 진균 *Aspergillus fumigatus*에서 추출된 항생물질로써, 현재 노제마병의 치료에 가장 많이 쓰이는 치료제이고, 특히, 겨울철과 이른 봄에 급여하면 노제마의 발병을 크게 감소시키는 것으로 보고되었다(Gochnauer and Fugala, 1962).

국내에는 후미딜B, 후마길비, 후마길린B, 그리고 녹수 후마길린의 상품명으로 Fumagillin제제가 판매되고 있으며, 각기 용량과 용법이 상이하다. 각 제품을 사용한 처리법은 각 제품설명에 따라야 할 것이다.

한편, 본 연구진은 후미딜B를 대상으로 용법과 용량을 현장실험을 통하여 조사한 바 있으며, 당 제품에서 제시한 용량의 정량, 1/2 또는 1/3 까지 같은 수준의 노제마포자 감소효과를 확인하였다. 또한 정량의 8배에 이르는 고용량 투여에서도 꿀벌에게 미치는 뚜렷한 위해현상을 발견하지 못하였다(윤병수, 2009, unpublishe data).

나. 그 외의 노제마 제어 약품들

국내에서 쉽게 입수 가능한 노제마병 제어 약품들은 Fumagillin제제외에 노노스 등이 있다. 이 약제들의 용량과 용법은 제작자의 지시에 따른다.

표 4. 국내에서 입수 가능한 노제마병 제어제들

제품명	주성분명	성상	급이방법
후미딜비	Fumagillin	분말	사양수에 희석 급이
후마길비	Fumagillin	분말	사양액에 용해 급이
후마길린-B	Fumagillin	분말	사양수에 희석 급이
녹수 후마길린	Fumagillin	분말	사양수에 희석 급이
노노스(Nonos)	Sodium salicylate + Beta-vulgaris	용액	사양액에 혼합 급이
노제시드	Sodium salicylate + Beta-vulgaris	용액	사양액에 혼합 급이
구제잘	Citric acid + Thimerosal	분말	사양액에 용해 급이

4. 백묵병(CB), 석고병(SB) 등 병원성 진균에 대한 처치

편의상 백묵병(Chalk brood)은 *Ascospaera apis*에 의한 진균성 꿀벌질병이며, 석고병(Stone brood)은 *Aspergillus flavus* 등 *Aspergillus* species에 의한 진균성 꿀벌질병이나, 백색 또는 흑색의 딱딱한 꿀벌 사체를 발견하게 되는 일반 양봉인에게 양자의 구별은 매우 어렵다.

한편, 동물에게서 진균의 감염을 안전하게 제어하는 약제의 개발은, 항생제로 세균의 감염을 제어하는 것 보다 매우 더디고, 상대적 고가로 공급되기에, 사람의 경구용 무좀약을 의사 처방하에 널리 사용하게 된 것도 최근의 일이다.

특히, 백묵병 및 석고병의 발생장소인 소방(벌집)은, 식품인 벌꿀이 저장되는 곳이며, 이로써 항진균제의 처치는 바로 벌꿀에 잔류될 수 있다는 개연성 때문에, 인체에 안전한 항진균제로 꿀벌에 사용할 수 있는 것은 항진균제를 찾는 것은 매우 어렵다 할 것이다.

현시점에서 진균성 꿀벌질병에 대한 약제 처방은 소독제 수준에 머물 수 밖에 없으며, 사양관리의 강화, 독성 및 잔류성이 낮은 약제의 사용 등 친환경적 방법을 우선으로 하여야 할 것이다.

가. 사양관리에 강화에 의한 진균성 질병의 극복

백묵병 등 진균성 꿀벌질병에 대항하는 사양관리의 요점은 강균양성이다. 강균양성은 소비의 축소, 여왕봉의 교체, 합봉, 사양강화 등의 방법으로 추구하며, 이 과정에서 백묵병 등에 감염되어 약화 또는 치사된 larvae를 빠르게 배출시키기를 기대하는 것이다. 치사된 larvae는 대량의 백묵병균 포자를 보유하여 재감염의 원천이 되며, 이들의 빠른 제거는 질병의 극복으로 통하는 것이기 때문이다.

강균양성의 과정에서 축소 후 사양을 강화하는 것은 봉군의 생존욕구에 의해 치사체의 배출(청소행위)에 도움을 주며, 여왕봉의 교체는 보다 많은 산란으로 질병기에 있는 봉군을 강군으로 유지시키기를 기대하는 것이다.

여왕봉 산란을 억제시키면, 배출되는 백묵병 치사체가 감소되어 백묵병을 극복한 것으로 오해할 수 있으나, 이는 백묵병이 감염될 larvae의 수가 줄어들어 생긴 일시적 현상일 뿐, 봉군전체가 약군으로 전락되는 점에 주의하여야 한다.

한편, 백묵병의 포자는 10년 이상 감염력을 유지할 수 있다. 봉군이 강군으로 유지될 때, 백묵병의 징후는 뚜렷하게 나타나지 않으나, 한번 백묵병이 발병된 소상과 소비는 백묵병 포자의 원천이기에, 이들을 별도 관리하여야 하며, 소상은 철저한 소독 후 재사용이 가능하지만, 소비의 재사용은 극히 조심하며, 최종적으로 소각처리하여 백묵병 전파를 차단시켜야 할 것이다.

나. 그 외의 진균성 질병에 대한 약품들

(1) 프로피온산 나트륨

프로피온산(propionic acid) 훈증성 약제는 백묵병의 치료제로 다년간 사용되어 왔다. 프로피온산 나트륨은 꿀벌에 대하여 강한 산란억제를 야기하는 성질이 있으며, 산란억제로 인하여 백묵병 치사체의 배출이 감소되나, 이는 일시적 현상으로 결국 봉군은 약균으로 전락되는 치명적 약점이 있었다. 물론 백묵병의 포자는 잔류되기에, 이런 점을 충분히 고려하여야 할 것이다.

(2) 비넨볼(Bienewohl)을 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어

BienenWohl은 식물성 Flavinoid(프라비노이드)를 주성분으로 하며 꿀벌응애 구제제로 알려져 있다. 그러나 이 약제의 주성분인 꿀벌응애에 대한 방제효과와 함께, 꿀벌의 청소욕구를 자극하고, 산란촉진에도 효과가 있다고 보고되어, 진균성질병의 제어에 간접적 효과를 인정할 수 있을 것이다. 용법과 용량은 꿀벌응애의 구제의 경우와 같이, Bienenwohl 용액 1ml 씩을 각 소비사이에 흘려 넣어주는 간단한 것이며, 5°C 이상의 기온에서만 사용한다.

(3) 알보픽스(Albofix) 또는 PWO를 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어

Albofix 그리고 Albio K는 천연 목재의 추출물(목재액)로 일찍이 그 향진균성이 발견되어 많은 식품가공업, 식품제조업의 현장에서 향진균 도료(페인트)로 사용되어 왔다. 작용기전은 자세히 알려져 있지 않으나, 오랜 기간 인체 안전성이 입증되었고, 또한 긴 약효의 지속성이 있으며, 직접 접촉이 아닌 공기를 통한 약리 효과의 입증 등의 장점이 있다.

한편, Pure Wild Organo Oil (PWO)는 식용의 허브 추출물로 독특한 향기를 가지고 있으며, 15세기부터 민간의약품으로, 방부제로, 향진균의 효과를 인정받는 물질이다.

Albofix, AlbioK, Pure Wild Oil 모두 공기 중 확산법에 의하여 백묵병의 *Ascosphaera apis* 그리고 석고병의 *Aspergillus flavus*의 성장을 효과적으로 저해하였으며, 약제의 처리에서 용량-반응 관계(Dose-effect relationship)을 입증하였다. 상기약제의 사용을 위한 용법 및 적정 용량에 대하여는 추가적 연구가 보다 더 필요하며, 해당 논문을 아래에 기재한다.

* 이혜민 등, 2005. 향진균제 AlbioK와 Pure Wild Organo Oil을 사용한 꿀벌 백묵병의 예방. 한국양봉학회지. 20(1):19-28.

* 이혜민 등, 2003. 향진균제 Albofix에 의한 꿀벌 백묵병의 방제와 제어. 한국양봉학회지. 18(2):139-150.

5. 꿀벌의 병원성 바이러스에 대한 처치

꿀벌의 바이러스성 질병은 보통 눈에 띄지 않는 피해를 야기시키나, 꿀벌들이 봉장 바닥에 널리 기어다니는 현상, 몸을 떠는 마비현상, 날개가 불구가 되는 현상 등으로 양봉인에게 질병발생을 인식시키게 된다. 근래 국내 토봉을 거의 괴멸시킨 kSBV는 변종 바이러스의 출현에 의한 것으로, 바이러스질병에 대한 제어법의 부재로 큰 국가적 손실을 감수하게 한다는 사실을 알려 주었다.

다양한 꿀벌바이러스들은 다양한 질병을 야기시키나, 개별 꿀벌 바이러스에 대한 치료법은 현재 거론될 수 있는 수준도 아니며, 사실, 사람에 대한 HIV의 공격도 최근 간신히 대응책의 가닥을 잡는 현실임을 생각하면, 꿀벌에 대한 현재의 지식과 기술 수준으로 꿀벌바이러스질병에 대항하는 방법은 상대적으로 제한적일 수 밖에 없을 것이다.

따라서, 현시점에서 바이러스성 꿀벌질병에 대한 약제 처방은 소독제 수준에 머물 수 밖에 없으며, 꿀벌응애 구축에 의한 바이러스 매개체의 제거가 필수적이다. 그러나 이들 치료방법 보다는 사양관리의 강화 등 친환경적 방법을 통한 예방이 우선적으로 수행되어야 할 것이다.

가. 사양관리에 강화에 의한 꿀벌 바이러스성 질병의 극복

SBV, DWV 등 바이러스성 꿀벌질병에 대항하는 사양관리의 요점은 강균양성이다. 강균양성은 소비의 축소, 여왕봉의 교체, 합봉, 사양의 강화 등의 방법으로 추구하고, 이 과정에서 꿀벌바이러스에 감염되어 약화 또는 치사된 larvae를 빠르게 배출시키기를 기대하는 것이다. 치사된 larvae는 대량의 병원성 바이러스를 보유하여 재감염의 원천이 되며, 이들의 빠른 제거는 질병의 극복으로 통하는 것이기 때문이다.

강균양성의 과정에서 축소 후 사양을 강화하는 것은 봉군의 생존욕구에 의해 치사체의 배출(청소행위)에 도움을 주며, 여왕봉의 교체는 보다 많은 산란으로 질병기에 있는 봉군을 강군으로 유지시키기를 기대하는 것이다.

한편, 꿀벌의 병원성 바이러스는 수년간 감염력을 유지할 수 있다. 봉군이 강군으로 유지될 때, 바이러스 질병의 징후는 뚜렷하게 나타나지 않으나, 한번 바이러스질병이 발병된 소상과 소비는 바이러스의 원천이기에, 이들을 별도 관리하여야 하며, 소상은 철저한 소독 후 재사용이 가능하지만, 소비의 재사용은 극히 조심하며, 최종적으로 소각처리하여 바이러스병 전파를 차단시켜야 할 것이다.

나. 꿀벌응애의 구축에 의한 바이러스성 질병의 극복

꿀벌응애가 다종의 바이러스를 꿀벌 간에 매개시키는 전파자임은 확실히 입증되어 있다. 따라

서 꿀벌응애의 구축은 바이러스성 질병의 극복을 위하여 필수적이며 우선적으로 처치하여야 한다.

꿀벌응애의 구축법은 제 3 장, 제 13 절 꿀벌 질병의 진단에 따른 표준 처방 중, “1. 꿀벌의 감염성 질병 치료를 위한 꿀벌응애 구축법들”에서 상술하였기에, 중복을 피하기 위하여 본항에서는 생략한다.

다. 그 외의 바이러스성 질병에 대한 소독제들

본 항에서 제시하는 약품들은 범용성 소독제이다. 꿀벌바이러스질병에 대한 제어책으로 소독을 강화하는 것은 최소한 간접적 효과가 있을 것으로 기대하는 것이며, 감염될 수 있는 꿀벌바이러스의 개체수를 감소시키자는 것이다. 이 소독제의 사용에 대한 효과는 의문이 있으나, 바이러스 개체수 감소, 전파의 차단등을 고려하여 적절히 시행하는 것이 합리적이라 할 것이다.

(1) 라이프자켓(Lifejacket-T)에 의한 소독법

라이프자켓(Lifejacket-T)은 근래 국내의 구제역 사태에 전국의 도로 등에 대량 살포되었던 삼중염 발포용 소독제(Potassium monopersulfate triple salt)와 같은 성분이다. 많은 세균, 진균, 바이러스에 대한 소독 효과가 입증되었고, 인체 및 가축, 식물 등에 독성이 매우 적은 소독제로 용량을 적절히 조절할 수 있다면, 그 소독 효능을 기대할 수 있다.

소상 및 양봉기구에 대한 소독은 유효하며, 봉장을 폭넓게 소독하는 것도 유효하나, 이를 봉충이 있는 소비에 직접 분무하는 것은, 바이러스에 대한 소독효과 이전에 물방울에 의한 어린 larvae의 위해들도 고려하여야 하며, 우선, 소비에 약제의 분무를 위한 적정 용량 및 용법의 연구가 선행되어야 할 것이다.

소상, 양봉기구 및 봉장소독을 위한 용량 용법은 제작자의 지시에 따른다.

(2) 락스에 의한 소독법

락스는 차아염소산나트륨(NaClO)의 수용액으로, 보통 유효염소를 4%이상 함유한 것이 원액으로 제작되어, 일반적인 식품의 살균, 주방 및 욕실의 위생을 위하여 널리 사용되기에 쉽게 구입할 수 있는 장점도 있다. 락스의 희석액은 소독력이 우수하며, 99.9%이상의 일반 바이러스 제거를 기대할 수 있고, 용량과 용법을 잘 지킬 수 있다면 특별한 잔류성이나 독성을 고려하지 않아도 된다.

락스의 희석은 4%이상 유효염소를 함유한 원액을 물과 500배, 300배, 25배 희석하여 사용하며, 500배 희석액은 과일, 채소 등의 살균에 사용되고, 그 용법은 500배 희석액에 과일, 채소를 5분간 담가 두었다가 꺼내어, 다량의 물로 잔여 용액을 씻어내는 것이다.

300배의 희석액은 주방 및 욕실의 살균 소독에 사용되며(처리후 다량의 물로 잔여량 제거), 25배 희석액은 스폰지 등에 ane혀서 사용하며, 역시 다량의 물로 잔여량을 제거하여야 한다.

일반적 소상의 소독은 300배 희석액을 사용하여 소상의 내부를 충분히 적신 후, 5분간 약제가 충분히 작용하도록 정치시키고, 다량의 물로 세척하면 될 것이며, 꿀벌 질병에 감염되었던 소상의 소독은 25배 희석액을 사용하여, 같은 용법으로 시행하면 유효할 것이다(세척 후 간단한 화염멸균은 건조에 도움을 주며 소독 효과를 배가시킬 것임) .

양봉기구의 소독도 소상의 경우를 준용하면 될 것이나, 특히 봉솔의 경우, 락스에 의한 소독이 가장 간편하며, 주기적인 소독으로 봉군간 병원체의 전파를 근원적으로 차단하는 것이 유리할 것이다. 한편, 금속기구의 경우, 락스에 의한 소독은 부식을 야기시킬 수 있으며, 스테인레스 스틸도 장시간 희석액에 담가두면 부식될 수 있기에 조심하여야 한다.

반면, 소비의 소독은 소비면의 벌집 구조상 500배 락스 희석액에 담가두는 것만으로 락스액이 소방 내부로 접촉됨이 불완전하며, 차후 세척도 불안정하기에 어려운 점이 있다. 500배 락스 희석액을 소비에 분무시키고, 또한 세척액을 분무시켜 세척해 낼 수는 있으나, 분무과정에서 락스분무액의 흡입, 눈에 접촉 등 보다 심각한 문제를 야기시킬 수 있기에 삼가야 할 것이다. 락스의 취급은 고무장갑을 사용하고, 통풍에 유의하여 분무된 락스액을 흡입하지 않도록 하며, 원액 또는 희석액이라도 피부, 특히 눈에 접촉하였을 경우 다량의 물로 세척하고 의사의 지시를 받아야 할 것이다.

락스에 의한 소독도 멸균이 아닌 소독임을 주의하여야 한다. 잘 소독된 소상도 병원체가 소수 존재할 수 있으며, 다만 병원체의 개체수를 크게 감소시켰다는 의미로 봉장을 운영하여야 할 것이다.

(3) 화염에 의한 소독법

소형 부탄가스통에 부착하는 “토치”류는 쉽게 화염을 만들 수 있다. 화염멸균은 소상 등의 일반 소독에 매우 유용하며, 양봉기구의 간단한 소독에도 매우 편리하다.

화염에 의한 소상의 소독은 소상내부의 목재 부분이 화염에 의해 약간 그슬리는 정도로 충분하며, 과도한 화염처리는 크게 도움이 되지 못한다. 목재 또는 철제 양봉기구에 대한 화염 소독도 매우 유효하며, 역시 약간 그슬리는 정도로 처치하여야 한다. 철제기구를 달아오를 정도까지 화염을 가하게 되면, 소독보다는 멸균에 가까울 정도로 완벽할 것이나, 이후 금속표면이 쉽게 부식될 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

○ 연구 협약서의 연구개발 목표 및 내용

목표 : 국내 발병이 확인된 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단시스템을 확립

내용 1) 꿀벌 주요 질병에 대하여 각 특이 병원체의 신속검색을 위한 실시간 정량 PCR법을 신규 또는 개선 개발함. 2) 꿀벌 주요 질병의 병원체에 대하여, 재조합 DNA방법 등에 의하여 각 특이 항원단백질을 생산하고, 이어 하이브리도마법을 이용한 특이항체를 생산하고자 함. 3) 특이 항체를 이용 ELISA법에 의한 면역학적 진단법 및 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트를 개발함. 4) 질병시료로부터 병원체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 일괄 표준 실험법을 확립함. 5) 유효 약제, 예방요령 등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하여, 진단결과와 함께 표준 처방 지침을 통보할 수 있도록 하는 것을 목표로 한다.

○ 본 과제의 연구결과들 및 목표달성도

본 연구에서 선택된 꿀벌의 질병은 국내발병이 확인된 15종의 병원체 및 질병으로, 이는 세균성 질병이 2종, 진균성 질병 2종, 원생동물성 질병 2종, 바이러스성 질병 9종이다. 이들은 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascosphaera apis* (CB; 백목병), *Aspergillus fulavus* (SB; 석고병), *Nosema apis* (노제마병), *Nosema cerana* ((노제마병), Acute Bee paralysis virus (ABPV; 급성마비병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Kashmir Bee Virus (KBV; 캐시미어 봉증), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병), korean Sac Brood Virus (kSBV; 한국형 낭충봉아병), 그리고 본 연구에 의해 국내 존재함이 밝혀진 Kakugo Virus (KV; 미친벌증)들이다.

이들 모든 꿀벌질병에 대한 진단법 확립을 위하여, 본 연구는 병원체를 찾아내는 분자적 진단법을 기본으로 하여 15종 꿀벌 질병에 대한 각 특이 병원체의 신속검색을 위한 실시간 정량 PCR법, 초고속 PCR법들을 다수 신규 개발하였으며, 기존에 이미 개발된 검사법이 있는 병원체에 대하여는 재평가를 통한 선별 또는 민감도, 특이도를 개선하여 개선 개발을 수행하였고, 모든 15종 병원체에 대한 분자진단법을 완비하게 되었다.

또한, 현장의 시료에서 비전문가에 의한 과학적 질병진단을 위하여, 특이 항원을 이용하여 생산된 특이 항체로 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트(Lateral

flow chromatography)를 개발하였으며, 같은 목적으로 보다 민감한 특이 염기서열을 증폭시키는 방법인 등온핵산증폭법 (Isothermal Loop-mediated Amplification; LAMP)에 근거한 검색법을 다수 신규 개발하였다.

아울러, 질병시료로부터 병원체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 실험실적 일괄 표준 실험법을 PCR법과 실시간 PCR법으로 확립하였으며, 보다 신속한 결과도출을 위한 초고속 PCR법도 주요 질병에 한하여 적용시킬 수 있도록 하였다. 한편 양봉현장의 신속 진단을 위하여 꿀벌 주요질병에 대한 면역크로마토그래피법 및 LAMP법을 적용할 수 있도록 하였으며, 아울러 진단결과에 따라 유효 약제, 예방 요령 등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하였으며, 진단결과와 함께 표준처방 지침을 통보할 수 있도록 하였다.

구체적으로 꿀벌 병원체를 검색할 수 있는 다양한 검출법 신규 개발한 결과, 총 10종의 꿀벌병원체에 대한 19종의 검색법을 신규 개발하였다. 또한 기개발된 실험법에 대한 개선을 통하여, 상기 15종의 꿀벌질병에 대한 실험실적 통합 검색법을 완전히 시스템화 하였고, 이는 일반 PCR로도, 실시간 PCR로도 모두 가능하도록 하였다. 더 나아가, 빠른 검사를 위하여 초고속 PCR법을 적용하였으며, 초고속 PCR이 가능한 대상 병원체는 8종에 이르게 하였다.

한편, 현장 검사의 경우, LAMP법에 의하여 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병) 등 8종의 주요 병원체를 검사할 수 있도록 개발하였으며, 면역클로마토그래피에 의한 Rapid kit의 개발에서도 *Paenibacillus larvae* (AFB) 등 7종이 검색될 수 있도록 하였다.

총괄적으로 이 모든 검색법들은 하나의 흐름으로 검사가 진행될 수 있도록, 시스템화, 매뉴얼화하였으며, 진단결과에 따라 검사의뢰자에게 통보될 수 있는 현재 시점에서 가장 합리적인 표준처방들을 제정하였다. 본 연구의 결과 등에 힘입어, 꿀벌병원체에 대한 진단은 꿀벌시료(알, 애벌레, 성충, 벌꿀)의 접수에서 시작되며, 분자진단은 시료의 정제 및 준비, 실험실적 분자 검색, 현장검사용 분자검색, 그리고 표준 처방까지 진단과정의 시스템에 의해 수행될 수 있게 되었으며, 검사의뢰자에게 진단결과와 함께 표준처방 및 처리 지침을 통보할 수 있도록 되었다.

본 연구의 성과 중 가장 큰 성과는 꿀벌질병을 체계적으로 진단할 수 있는 분자적 검사법을 기본적 의미에서 확립한 것이라 할 것이다. 이는 과학적 진단결과에 따라 양봉농가가 꿀벌질병에 대한 처치 및 제어를 하는 것이 가능하게 되었다는 것이다.

본 연구의 연구성과들은, SCI저널에 1편, 국제전문학술지에 12편, 국내등재학회지에 12편 등 총 25편의 학술논문이 출판되었으며, 또한 수많은 논문들이 다양한 국제학회, 국내학회에서 발표되었다.

또한 산업적 구체적 성과물로는, 1) 꿀벌질병 15종의 진단용 PCR kit, 2) 꿀벌질병 15종의 진단용 실시간 PCR kit, 3) 꿀벌 주요질병 8종의 진단용 초고속 PCR kit, 4) 꿀벌 주요질병 8종의 현장진단용 LAMP kit, 5) 꿀벌 주요질병 7종의 현장진단용 Rapid kit (Immunochromatography) 등을 들수 있다. 이중 4) 꿀벌 주요질병 8종의 현장 진단용 LAMP kit,는 (주)GeneClone에서 시제품이 생산되었으며, 5) 꿀벌 주요질병 7종의 현장진단용 Rapid kit는 (주)BioNote에서 시제품이 생산되었다.

결론적으로 본 연구자들은 계획서상의 목표를 크게 초과달성하였다고 자부하며, 본 연구가 가능하도록 연구비를 지급하였주신 농림부 당국에 감사하는 바이다.

○ 연구개발 결과 성과 달성표

(단위 : 건수)

연구 기간	산업.지식재산권		시제품 생산				유전자원 등록	논문			기타
	출원	등록	특이 진단키트	면역학적 진단키트				SCI	국제 학술지	국내	
2010.07.01 ~ 2013.06.30	2	2	7	7				1	12	12	
계	2	2	7	7				13	12		

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

제 1 절. 연구성과물들의 개요.

본 연구의 연구개발 목표는 “국내 발병이 확인된 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단시스템을 확립”하는 것이며, 그 내용은 아래와 같았다.

1) 꿀벌 주요 질병에 대하여 각 특이 병원체의 신속검색을 위한 각종 PCR법을 신규 또는 개선 개발함. 2) 꿀벌 주요 질병의 병원체에 대하여, 재조합 DNA방법 등에 의하여 각 특이 항원 단백질을 생산하고, 이어 하이브리도마법을 이용한 특이항체를 생산하고자 함. 3) 특이 항체를 이용 ELISA법에 의한 면역학적 진단법 및 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트를 개발함. 4) 질병시료로부터 병원체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 일괄 표준 실험법을 확립함. 5) 유효 약제, 예방 요령 등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하여, 진단결과와 함께 표준 처방 지침을 통보할 수 있도록 한다.

본 연구의 총체적 결과로써, 우선 국내 발병이 확인된 12종의 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단시스템을 확립하였으며, 이 질병들은 미국부저병 (AFB), 유럽부저병 (EFB), 백묵병 (Chalkbrood), 노제마병 (Nosema Disease)의 2종, 낭충봉아부패병(Sacbrood) 및 최근 국내의 토종벌을 거의 괴멸수준으로 피해를 입힌 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 (Korean Sacbrood Virus; kSBV), 만성마비병 (Chronic bee paralysis virus), Black queen cell virus, 날개불구병 (Deformed wing virus) 및 Israel acute paralysis virus 그리고 본 연구를 통하여 국내 발병이 확인된 Kakugo virus들이다.

우선, 이들 모두에 대하여 최소 1가지 이상의 진단법을 확립하였으며, 이중 신규 개발된 진단법의 수를 집계하면, 초고속 PCR법이 8종, PCR법이 9종, LAMP법이 8종, 그리고 재조합 DNA방법에 의한 생산 또는 분리된 항원을 이용한 각각의 특이 단클론항체의 제작, 그리고 그 특이 항체를 이용한 Rapid kit (Immunochromatography법)가 7종이었다. 또한 꿀벌의 질병시료(애벌레 및 성충)으로부터 DNA 및 RNA의 genome을 갖는 병원체를 일괄적으로 쉽게 분리하고 유전자검사 및 항원검사를 수행할 수 있는 일괄 진단실험법을 제정하였으며, 진단결과에 따라 유효 약제를 추천할 수 있는 표준 처방을 또한 제시하였다.

본 연구의 성과물 중 DNA 및 RNA genome을 갖는 병원체들에 대한 유전자 검사의 kit로써, 우선, LAMP키트들은 (주)GeneClone과 협의를 거쳐 7종의 시제품을 생산하였으며, 다른 병원체에 대한 LAMP kit들과 초고속 PCR kit 및 일반 PCR kit들도 그 상품화를 협의 중에 있다. 이 내용은 “제 3장 연구개발수행 내용 및 결과, 제 11절 꿀벌 병원체에 대한 다중 검사체계의 확립”에 기술되어 있으며, 본 란에서는 중복을 피하기 위하여 제작된 LAMP 시제품들을 나열하였다.

제 2 절. 본 연구에 의하여 발표된 학술논문들

본 연구의 결과들은 국제 SCI 저널에 한편의 논문으로, 국제 전문학술지에 12편의 논문으로, 또한 국내 전문학술지에 12편의 논문으로 각각 출판되었음. 한편, 많은 국제학술대회 및 국내 학술대회에서 다수의 논문들이 구두 또는 포스터의 형식으로 발표되었으나, 학술대회 발표들은 수록을 생략하였음.

(1) 국제 SCI 논문 (1편)

1. Mi-sun Yoo, Kim Cuc Nguyen Thi, Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Soon-Hwan Kwon, Byoung-Su Yoon 2011. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 179(1) : 195-200

(2) 국제 전문학술지 논문 (12 편)

1. Phu Van Nguyen , Ji-Na No , Bo-Ram Lee , Mi-Sun Yoo , Byoung-Su Yoon. 2011. Detection and Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Honeybees by ELISA using a Monoclonal Antibody. *Journal of Apiculture* 26(1): 71-77

2. Mi-Sun Yoo , Van Phu Nguyen , Ji-Na No , Bo-Ram Lee , Yong-Ha Park , Byoung-Su Yoon 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for the Detection of Nosema. *Journal of Apiculture* 26(1): 21-27

3. Mi-Sun Yoo , Sang-Hoon Han , Byoung-Su Yoon 2011. Development of UltraRapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus. *Journal of Apiculture* 26(3): 203-208

4. Ji-Na No , Sang-Hoon Han , Byoung Su, Yoon. 2011. Capsid Protein Gene Expression of Israel Acute Paralysis Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apiculture* 26(3) : 221-227

5. Nguyen V.P, Han H.H and Yoon B.S (2011. Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacilluslarvae*. *Journal of Apiculture* 26(3) : 213~220

6. Mi-Sun Yoo, Boram Lee, Phu Van Nguyen, Byoung-Su Yoon 2012. Purification of Recombinant Protein of Black Queen Cell Virus *Journal of Apiculture*. 27(1): 59-64

7. Boram Lee, Phu Van Nguyen, Soon-Bok Lee, Byoungsu Yoon. 2012. Identification of

Kakugo Virus in Honeybees from Korea. *Journal of Apiculture*. 27(1) : 45-49

8. Phu Van Nguyen, Boram Lee, Mi-Sun Yoo, Byoung-Su Yoon 2012. Development and Clinical Validation of a DNA Gyrase Subunit B Gene Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of *Melissococcus plutonius*. *Journal of Apiculture* 27(1): 51-58

9. Phu Van Nguyen, Boram Lee, Byoung-Su Yoon 2012. Over-expression and Purification of Capsid Protein of Sacbrood Virus in *E. coli*. *Journal of Apiculture* 27(3) : 209-214

10. Hee-Young Lim, Byoung-Su Yoon 2013. Rapid and Sensitive detection of Deformed Wing Virus (DWV) in Honeybee using Ultra-rapid Real-time PCR. *Journal of Apiculture*, 28(2) : 121-129

11. Hee-Young Lim, Joong-Goo Lee, Soon-Bok Lee, Ok-Min Lee , ByoungSu Yoon 2013. Application of Digital Infrared Thermal Imaging (DITI) as a Diagnostic Method for the Fate of Honeybee Colonies. *Journal of Apiculture*, 28(2): 147-153

12. Joong-Goo Lee, Phu Van Nguyen, Baek Jun Soo, Hee-Young Lim 2013. Detection of Capsid Protein of Sacbrood Virus in Honeybee using Monoclonal Antibodies. *Journal of Apiculture*. 28(2): 113-120

(3) 국내 전문학술지 논문 (12 편)

1. 노지나(Ji-Na No) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , Van Phu Nugyen, 윤병수(Byoung Su Yoon) 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)법을 이용한 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)의 신속 진단법 개발. 한국양봉학회지. 25(4): 253-258

2. 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No) , Nguyen Van Phu , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 박용하(Yong-Ha Park) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 *Nosema ceranae* 검출법 개발. 한국양봉학회지 25(4): 267-274

3. 노지나(Ji-Na No) , 이보람(Bo-Ram Lee) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 윤병수(Byoung Su Yoon). 2011 IAPV내의 capsid protein gene의 검출을 위한 RT-LAMP 법의 개발. 한국양봉학회지. 26(2): 119-127

4. 이보람(Boram Lee) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , Nguyen Van Phu , 노지나(Ji-Na No) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 백목병 원인균 *Ascosphaera apis*의 검출법 개발. 한국양봉학회지. 26(2) : 103-111

5. 유미선(Mi-Sun Yoo) , 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No) , Nguyen Van Phu , 윤병수(Byoung-Su Yoon). 2011. Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현 한국양봉학회지 26(4): 275-282
6. 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 윤병수(Byoungsu Yoon). 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발. 한국양봉학회지 26(4) : 267-274
7. 이보람(Boram Lee), Nguyen Van Phu, 유미선(Mi-Sun Yoo), 노지나(Ji-Na No), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 PCR법 개발 한국양봉학회지 27(2): 129-135
8. 이중구(Joong-Goo Lee), 이보람(Boram Lee), 이순복(Soon-Bok Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. 디지털 영상자료를 이용한 꿀벌 개체수 측정의 새로운 방법 한국양봉학회지. 27(2): 149-154
9. 이중구(Joong-Goo Lee), 이보람(Boram Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발 한국양봉학회지. 27(4): 267-274
10. 백종희(Jong-Hui Baik), 이중구(Joong-Goo Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. 꿀벌 유충에 의한 약제 감수성 평가 방법. 한국양봉학회지. 27(4): 315-319
11. 임희영(Hee-young Lim), 이중구(Joong-Goo Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2013. RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰 한국양봉학회지, 28(1): 63-73
12. 임희영(Hee-Young Lim), 이순복(Soon-Bok Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2013. 열화상 사진 자료에 기반한 꿀벌 봉군의 생사 진단 방법에 대한 고찰 한국양봉학회지. 28(1) : 57-62

제 3 절. 꿀벌 질병 진단을 위한 LAMP 키트 들

1. LAMP Detection Kit들의 설명서



EFB(European Foulbrood) Detection Kit :EFB GB LAMP(LK-EG30)

◆ Description

EFB(European Foulbrood) Detection Kit는 세균성 유럽부저병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 유럽부저병을 진단 할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(1.25mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
L Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다. 이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(1.25mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D·W		up to 20 μ l

2. 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.

3. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 62℃에서 60분간 incubation 한다.
4. 3번 반응 후 80℃에서 10분간 반응 후 종료한다.
5. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 CBPV병을 확인한다.

◆ **Application**

: Control DNA를 이용한 EFB Detection Kit의 최적조건

EFB Detection Kit의 최적 온도 확인

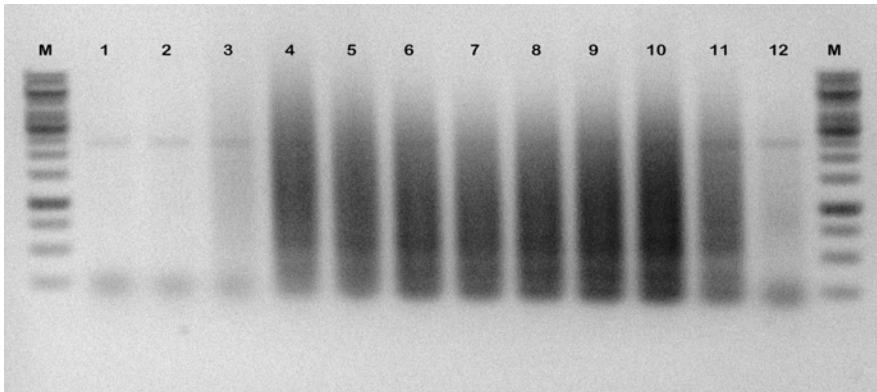


그림 1. EFB-Detection LAMP키트의 사용에서 incubation 온도에 따른 특이 염기 증폭 효과
lane M : Marker 1kb ladder, lane 1 ~ lane 12 : LAMP 표준 반응액으로 각기 40.0, 40.6, 42.1, 43.8, 46.5, 50.0, 54.0, 57.3, 60.1, 62.0, 63.4, 64.0℃에서 incubation하였음.

본 실험에서 최적 온도는 lane 10의 60℃로 측정됨.



그림 2. EFB(European Foulbrood) Detection Kit :EFB GB LAMP(LK-EG30)



SBV(Sacbrood Virus) Detection Kit :SBV LAMP(LK-S30)

◆ Description

SBV Detection Kit는 바이러스성 낭충봉아부패병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 낭충봉아부패병을 확인할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(2.5mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
LAMP Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(2.5mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D • W		up to 20 μ l

1. 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
2. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 57 $^{\circ}$ C에서 40분간 incubation 한다.
3. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
4. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 낭충봉아부패병

(SBV)을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 SBV Detection Kit의 최적조건 확인

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

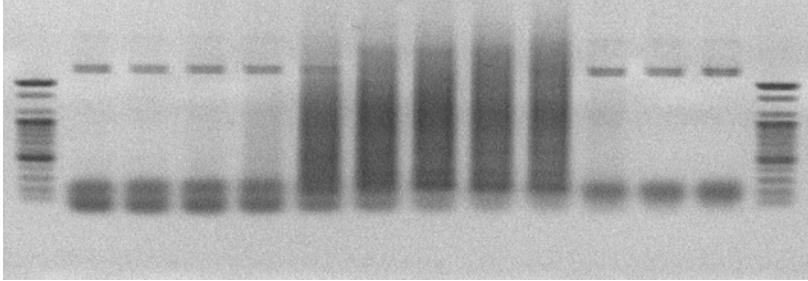


그림 1. 온도별 SBV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder, lane 1 to 12 : LAMP carried out at 45.0, 45.5, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, 64.6 and 65.0, respectively. Optimal temperature is about at 57°C in lane 7

시간별 SBV Detection Kit의 확인

M 1 2 3 4 5 6 M

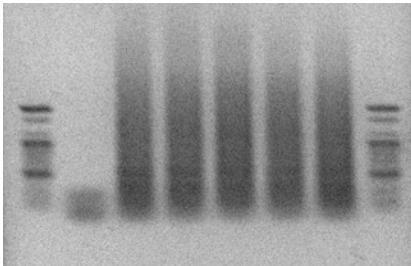


그림 2. 시간별 SBV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder, lane 1 to 6 : LAMP carried out for 20, 30, 40, 50, 60 and 90min, respectively. Optimal time is 40min.



그림 3. SBV(Sacbrood Virus) Detection Kit: SBV LAMP(LK-S30)



Nosema C(Nosema Cerena) Detection Kit

:Nosema C LAMP(LK-N30)

◆ Description

Nosema C Detection Kit는 원생동물성 노제마병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 노제마병을 확인할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(2.5mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
LAMP Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(2.5mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D·W		up to 20 μ l

- 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
3. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 57 $^{\circ}$ C에서 40분간 incubation 한다.
4. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
5. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 노제마병을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 Nosema C Detection Kit의 최적조건 확인

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

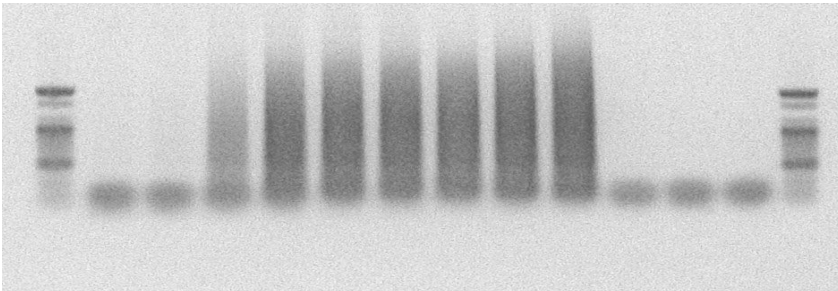
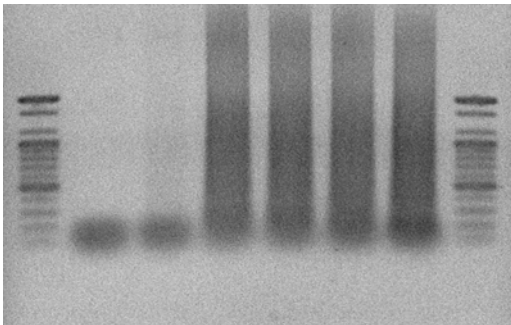


그림 1. 온도별 Nosema C Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder, lane 1 to 12 : LAMP carried out at 45.0, 45.5, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, 64.6 and 65.0, respectively. Optimal temperature is about at 57°C in lane 7

M 1 2 3 4 5 6 M



20' 30' 40' 50' 60' 90'

그림 2. 시간별 Nosema cerana Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder, lane 1 to 6 : LAMP carried out for 20, 30, 40, 50, 60 and 90min, respectively. Optimal time is 40 min.



그림 3. Nosema C(Nosema Cerana) Detection Kit: Nosema C LAMP(LK-N30)



IAPV Detection Kit

IAPV VP2 LAMP(LK-IV30)

◆ Description

IAPV(Israel Acute Paralysis Virus) Detection Kit는 바이러스성 IAPV병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 IAPV병을 확인할 수 있는 Control DNA (VP2)와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(2.5mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
LAMP Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(2.5mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D · W		up to 20 μ l

- 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
3. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 57 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation한다.
4. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
5. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 IAPV병을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 IAPV Detection Kit의 최적조건 확인

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

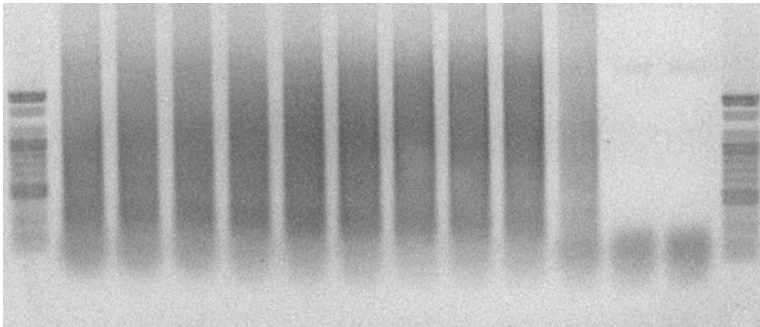
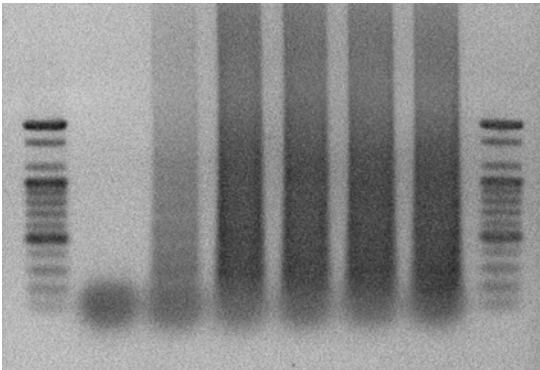


그림 1. 온도별 IAPV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder. lane 1 to 12 : LAMP는 표준조건에서 각각 45.0, 45.5, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, 64.6, 65.0°C에서 수행됨. 최적온도는 57°C (lane 7).

M 1 2 3 4 5 6 M



0' 20' 30' 40' 50' 60'

그림 2. 시간별 IAPV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder. lane 1 to 6 : LAMP carried out for 0, 20, 30, 40 and 60min, respectively. Optimal time is 30min.



그림 3. IAPV Detection Kit : IAPV VP2 LAMP(LK-IV30)



BQCV Detection Kit

:BQCV LAMP(LK-B30)

◆ Description

BQCV(Black Queen Cell Virus) Detection Kit는 바이러스성 BQCV병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 노제마병을 확인할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(5mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
LAMP Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.
(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(40pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(10pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(5mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D·W		up to 20 μ l

1. 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
3. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 57 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation 한다.
4. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
5. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 BQCV병을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 BQCV Detection Kit의 최적조건 확인

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

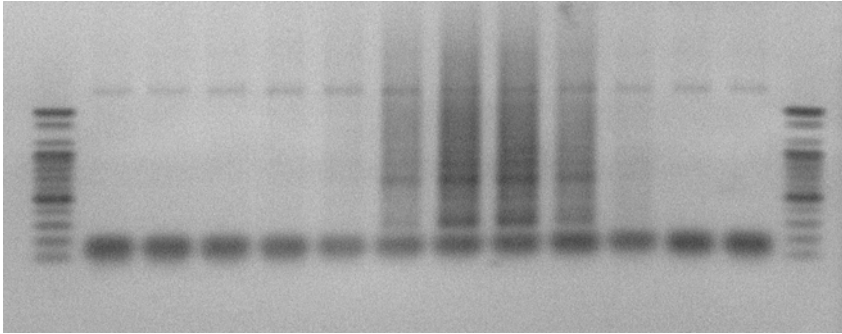
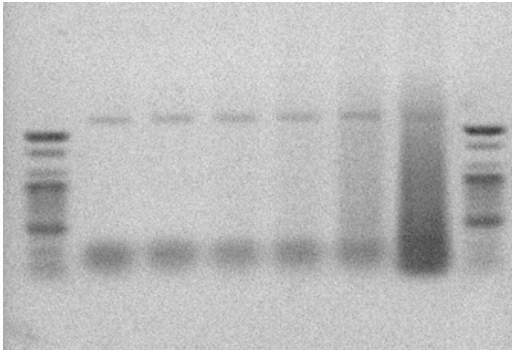


그림 1. 온도별 BQCV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder. lane 1 to 12 : LAMP carried out at 45.0, 45.5, 46.7, 48.2, 50.5, 53.4, 56.7, 59.6, 61.8, 63.4, 64.6 and 65.0, respectively. Optimal temperature is about at 57°C in lane 7

M 1 2 3 4 5 6 M



0' 20' 30' 40' 50' 60'

그림 2. 시간별 BQCV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder. lane 1 to 6 : LAMP carried out for 0, 20, 30, 40 and 60min, respectively. Optimal time is 60min.



그림 3. BQCV Detection Kit: BQCV LAMP(LK-B30)



CBPV(Chronic Bee Paralysis Virus) Detection Kit :CBPV LAMP(LK-C30)

◆ Description

CBPV(Chronic Bee Paralysis Virus) Detection Kit는 바이러스성 CBPV병 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 CBPV를 진단 할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA	1vial(30 μ l)
IF	1vial(30 μ l)
IR	1vial(30 μ l)
OF	1vial(30 μ l)
OR	1vial(30 μ l)
dNTP(1.25mM each)	1vial(30 μ l)
DMSO	1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer	1vial(60 μ l)
L Polymerase	1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(1.25mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D • W		up to 20 μ l

- 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
2. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 62 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation 한다.
3. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
5. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 CBPV병을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 CBPV Detection Kit의 최적조건 확인

온도별 CBPV Detection Kit의 확인

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M

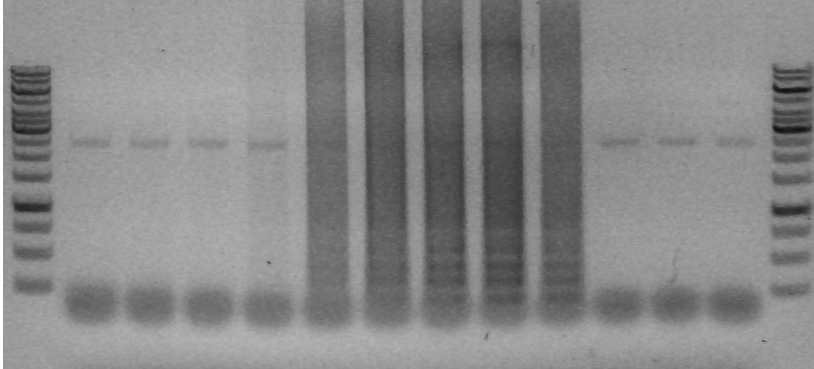


그림 1. 온도별 CBPV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 100bp ladder. lane 1 to 12 : LAMP carried out at 45.0, 45.6, 47.0, 48.7, 51.3, 54.6, 58.4, 61.7, 64.3, 66.1, 67.5 and 68.0, respectively. Optimal temperature is about at 62°C in lane 8



그림 2. CBPV(Chronic Bee Paralysis Virus) Detection Kit : CBPV LAMP(LK-C30)



DWV(Deformed Wing Virus) Detection Kit :DWV LAMP(LK-D30)

◆ Description

DWV(Deformed Wing Virus) Detection Kit는 바이러스성 DWV 진단 Kit입니다. 빠른 시간내에 쉽게 진단할 수 있는 Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 제품입니다. 제품에는 DWV를 진단 할 수 있는 Control DNA와 Prime가 포함되어 있습니다.

◆ Components of Kit

Control DNA		1vial(30 μ l)
IF		1vial(30 μ l)
IR		1vial(30 μ l)
OF		1vial(30 μ l)
OR		1vial(30 μ l)
dNTP(1.25mM each)		1vial(30 μ l)
DMSO		1vial(30 μ l)
10 \times Reaction Buffer		1vial(60 μ l)
L Polymerase		1vial(30 μ l)

◆ Storage condition

store at -20 $^{\circ}$ C

◆ Experiment Protocol

1. L Polymerase를 제외한 나머지 성분을 아래의 표와 같이 tube에 섞는다.

이 때 sample은 꿀벌에서 추출한 total RNA cDNA로 역전사효소 반응을 한 뒤 사용한다.(cDNA 기준 50ng)

Sample(또는 Control DNA)		1 μ l
IF primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
IR primer	(20pmole/ μ l)	1 μ l
OF primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
OR primer	(5pmole/ μ l)	1 μ l
dNTP	(1.25mM each)	1 μ l
DMSO	(최종농도 5%)	1 μ l
10 \times Reaction Buffer		2 μ l
L Polymerase	(8U/ μ l)	1 μ l
D·W		up to 20 μ l

1. 1번의 tube를 95 $^{\circ}$ C에서 5min간 incubation 후 ice에 1분간 정치시킨다.
2. L Polymerase를 2번에서 반응시킨 tube에 넣고 57 $^{\circ}$ C에서 60분간 incubation 한다.
3. 3번 반응 후 80 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 종료한다.
4. 반응을 종료한 진단 샘플을 1.2% Agarose Gel에 전기영동하여 CBPV병을 확인한다.

◆ Application

: Control DNA를 이용한 DWV Detection Kit의 최적조건 확인

온도별 DWV Detection Kit의 확인

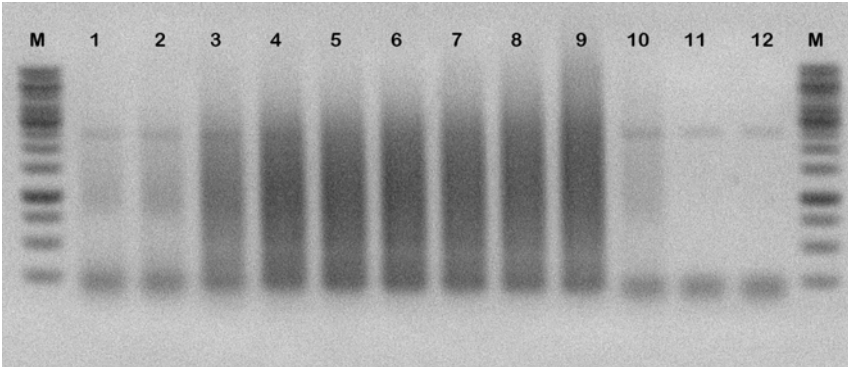


그림 1. 온도별 DWV Detection Kit의 확인

lane M : Marker 1kb ladder. lane 1 to 12 : LAMP carried out at 40.0, 40.6, 42.1, 43.8, 46.5, 50.0, 54.0, 57.3, 60.1, 62.0, 63.4 and 64.0, respectively. Optimal temperature is about at 57°C in lane 8.



그림 2. DWV(Deformed Wing Virus) Detection Kit: DWV LAMP(LK-D30)

제 4 절. 꿀벌 질병 진단을 위한 Immunochromatography 키트들.

본 연구에서 생산된 재조합 DNA법의 항원들, 그리고 순수 분리한 항원들은 모두 단클론 항체의 제작에 사용되었다. 이 중 특정 병원체에 대한 특이 항체 클론들은 최적의 Capture/Dectector 쌍을 선발하여 immunochromatography법에 의한 Rapid kit로 제작되었다

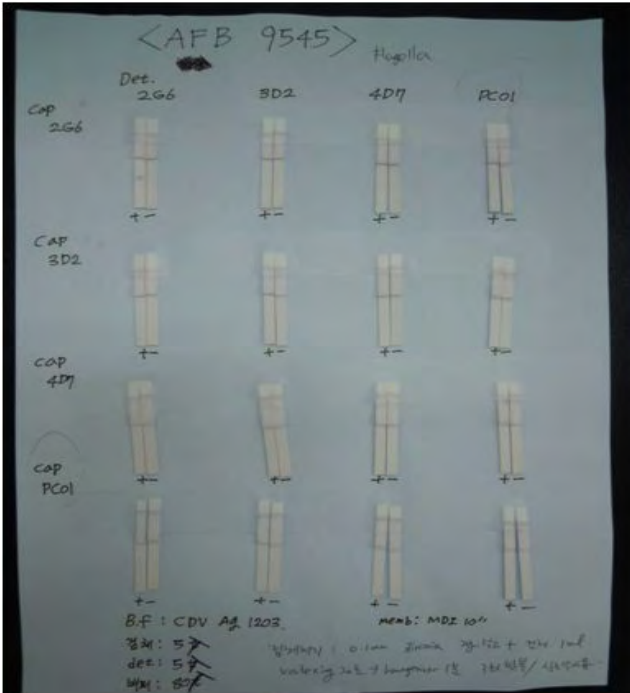
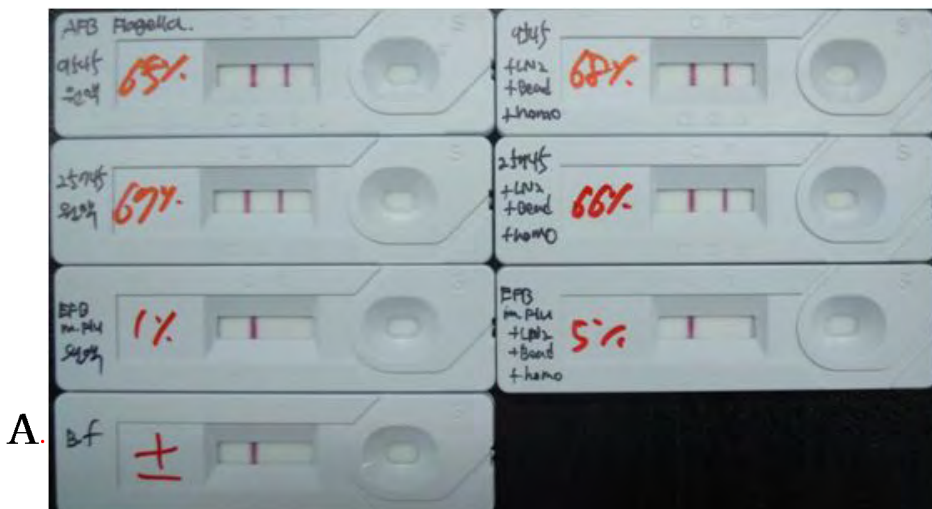
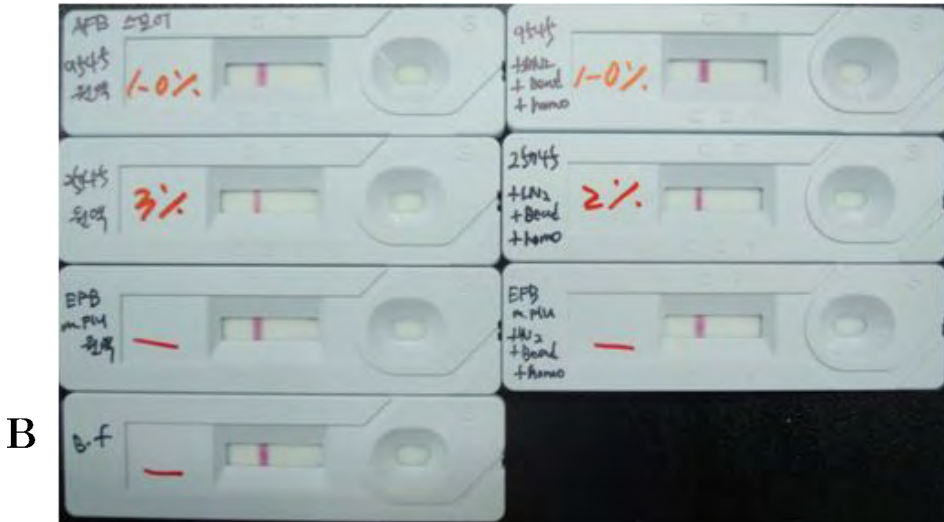


그림 1. AFB병원균 *P. larvae* ATCC 9545 항체들의 capture/detector pairing.

미국부저병(AFB)의 병원균인 *Paenibacillus larvae* ATCC 9545의 flagella항원으로 제작된 단클론 항체들의 pairing결과임. 선발된 항체들의 capture/detector pairing의 결과, 본 실험에서는 클론 2G6가 capture 및 detector 모두에서 가장 반응성이 우수한 것으로 판명됨.





B



C

그림 2. 항체들의 capture/detector pairing에 따른 시제품의 제작.

A. 미국부저병(AFB)의 병원균인 *Paenibacillus larvae* ATCC 9545의 flagella항원으로 제작된 단클론 항체들의 pairing 비교. B. 유럽부저병(EFB)의 병원균인 *Melissococcus plutonius*의 somatic 항원으로 제작된 단클론 항체들의 pairing 비교. C. 미국부저병(AFB)의 병원균인 *Paenibacillus larvae* ATCC 9545의 spore항원으로 제작된 단클론 항체들의 pairing 비교.

특이 항체를 사용하는 면역학적 키트(Rapid kit)들은 7종의 주요 질병에 대하여 현재 (주)Bionote와 제품화 실험을 진행 중이며, 출시될 제품에서 보다 반응성을 높이고자 노력 중에 있다. 한편, 다른 병원체에 대한 Rapid kit들도 그 상품화를 협의 하고 있으며, 아울러 꿀벌의 질병시료로부터 보다 쉽게 항원 단백질을 반응성 좋게 분리하기 위한 전처리 키트의 개발도 진행 중에 있다.

이하의 것들은 현재 개발된 면역학적 검사 시제품들의 사용설명서(예)와 각 제품의 사진들이다.

꿀벌의 미국부저병(AFB) 검출을 위한 면역학적 신속검사법 (Immunochromatographic rapid test: IC-PF-01)

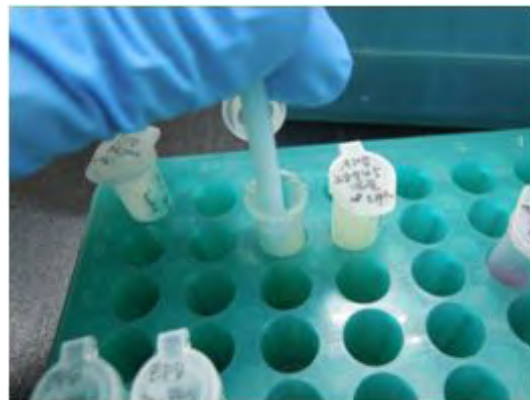
본 제품은 미국부저병(American Foulbrood; AFB)의 병원체인 *Paenibacillus larvae*에 대한 면역학적 신속검출법 키트(Immunochromatographic rapid test)로써, *Paenibacillus larvae*의 편모항원(flagella antigen)을 시각적으로 검출할 수 있게 개발되었습니다. 이는 양봉현장과 양봉질병검사실 모두에서 쉽게 사용할 수 있습니다.

제품의 구성품

1. Plastic cassette (검사의 플라스틱 본체)
2. 용출용 완충액 (glass bead와 buffer가 포함된 tube, 용량 0.8 ml)
3. 미니 분쇄기 (tube에 내부에 꼭 맞게 제조된 플라스틱 막자)

검사의 순서

1. 검사하고자 하는 꿀벌의 애벌레를 용출용 완충액의 튜브에 넣는다.
* 검체의 양은 0.2 ml를 기준으로 합니다. 이는 보통 꿀벌 성충 1마리에 해당되며, 애벌레의 경우 몇 마리를 모아서 사용하면 됩니다. 성충의 경우도 분쇄를 위하여 날개는 모두 제거되어야 하며, 머리 또는 가슴부분만 몇 마리 함께 분쇄하면 검출 확률을 높일 수 있습니다.
2. 미니분쇄기를 사용하여, 검체를 분쇄한다.
* 미니분쇄기는 튜브의 바닥에 꼭 맞도록 제작되어 있으며, 용출액내에는 작은 glass bead가 포함되어 있기에, 미니분쇄기로 누르고 또는 돌리면서 분쇄합니다. 분쇄시간은 약 30초 수준으로, 육안으로 보이는 덩어리가 없는 정도까지입니다. 용출액이 튜브밖으로 나오지 않도록 주의합니다.



3. 미니분쇄기를 사용하여, 용출액 수 방울을 본체(cassette)의 시료투입구(S)에 투입한다.
* 미니분쇄기는 끝이 큰 원추형으로 되어있어 큰 방울을 일시적으로 옮겨줄 수 있습니다. 분쇄된 용출액에 분쇄기 끝을 잠기게 하였다가 바로 본체 시료투입구위에 분쇄기 끝을 위치시키어 큰 방울로 떨어지게 합니다. 시료투입구는 본체에 S (sample)로 표시된 부분이며, 타원형이고 바닥에 흰색의

filter가 보입니다. 양은 크게 1방울이며 또는 작게 2-3방울이며, 부피로는 0.1 ml 내외입니다.

4. 본체(cassette)가 수평이 되게 두고 C선에 붉은 선이 형성되기를 기다린다.

* 본체의 plastic부분에 직사각형의 홈이 있고, 그 변에 “T”, “C”가 양각으로 표시되어 있으며, 홈의 바닥에 흰색의 filter가 노출되어 있습니다. 투입된 용출액은 T선을 지나 C선에 이를 것이며, C선에서는 검사결과가 양성이나 음성이나 붉은 선이 형성될 것입니다.

5. 결과의 판독: C선과 T선 모두에 붉은 선이 형성되면 양성으로 판정.

* T선과 C선 모두에서 붉은 선이 나타나면 “양성”, 즉 *Paenibacillus larvae*의 편모항원이 검체내에 있다는 것이며, 미국부저병의 원인균이 시료내에 존재한다는 결과입니다. C선에는 붉은선이 나타났으나, T선은 변화가 없거나 매우 미약하다면 “음성”으로 판정합니다. T선의 결과가 애매한 수준이면 “의양성”으로 판정할 수 있습니다. 단, C선은 검사결과가 양성이나 음성이나 붉은 선이 형성되어야 합니다. T선에 붉은 색이 나타나지 않는다면 그 결과는 “판정불능”으로 하여야 합니다.



제품의 원리

본 제품은 sandwich-type lateral flow assay로써, *P. larvae*의 편모항원과 특이적으로 결합하는 단클론항체 (*P. larvae* 특이 단항체; detector)와 colloidal gold가 결합된 conjugate를 시료 투입구 아래의 위치시키었고, 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)를 T (test) 선에 위치하게 하였습니다. 한편, 모든 항체(IgG)와 결합할 수 있는 항체를 C (control)선에 위치하게 하였습니다.

따라서, 검체(용출액)가 투입되면, 투입구 아래쪽에 위치한 *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은, 투입된 검체 중의 *P. larvae* 편모항원과 특이적 결합을 하게 되어 편모항원-항체-colloidal gold complex를 만들게 됩니다. 이 complex들은 모세관현상으로 nitrocellulose membran위를 이동하게 되며, 이 과정에서 T (test) 선에 위치한 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)에 편모항원-항체-colloidal gold complex 중의 편모항원이 결합됨에 따라, 편모항원-항체-colloidal gold complex는 T-선상에 축적되게 되게 됩니다. 이 축적된 complex중의 colloidal gold들은 시각적으로 T선이 붉은 선으로 보이게 하며, 양성판정을 하게 합니다.

한편, 검체 중에 병원균인 *P. larvae*가 없을 경우, 당연히 *P. larvae* 특이 편모항원도 없기에, 투입구 아래쪽에 위치한 *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은, 그대로 모세관현상으로 nitrocellulose membran위를 이동하게 되며, 이 과정에서 T (test) 선에 위치한 또 다른 *P. larvae* 특이 단항체(Capture)와 반응함이 없이 C선 쪽으로 이동하게 됩니다. C선에 이르면 모든 항체(IgG)와 결합할 수 있는 항체가 C (control)선에 위치하고 있기에, *P. larvae* 특이 단항체-colloidal gold conjugate 분자들은 C선에 축적되게 되며, 역시 colloidal gold에 의하여 붉은 선으로 보이게 됩니다.

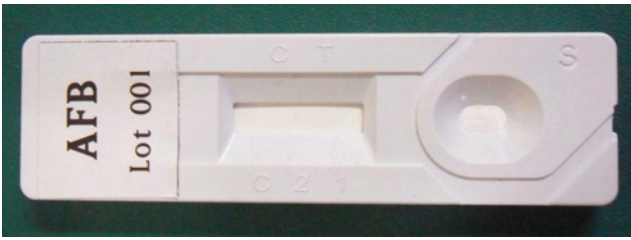


그림 3. 미국부저병(AFB) 진단용 rapid kit; *Paenibacillus larvae* spore 검출 immunochromatography (IC-PS-01)

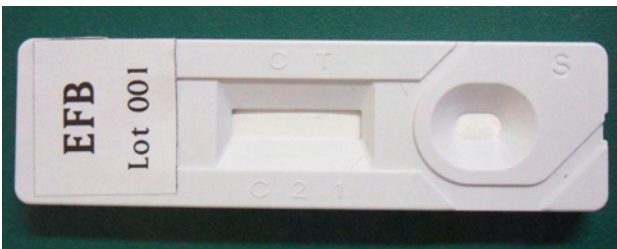


그림 4. 유럽부저병(EFB) 진단용 rapid kit; *Melissococcus plutonius* 검출 immunochromatography (IC-MP-01)

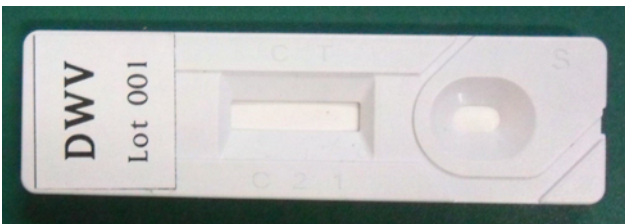


그림 5. 날개불구병(DWV) 진단용 rapid kit; Deformed Wing Virus 검출 immunochromatography (IC-DWV-01)



그림 6. 낭충병(SBV) 진단용 rapid kit; Sac Brood Virus 검출 immunochromatography (IC-SBV-01)



그림 7. 만성마비병(CBPV) 진단용 rapid kit; Chronic Bee Paralysis Virus 검출 immunochromatography (IC-CBPV-01)



그림 8. 이스라엘 급성마비병(IAPV) 진단용 rapid kit; Israeli acute Paralysis Virus 검출 immunochromatography (IC-IAPV-01)



그림 9. 흑색여왕벌병(BQCV) 진단용 rapid kit; Black Queen Cell Virus 검출 immunochromatography (IC-BQCV-01)

제 5 절 꿀벌 질병시료에 대한 다중 검사체계 및 표준 처방

꿀벌 질병시료에 대한 접수부터 진단을 위한 다중 검사체계의 흐름 그리고 표준처방은 본 연구보고서의 “제 3장, 제 12 절 꿀벌 질병시료에 대한 다중 병원체 검사체계, 제 13 절 꿀벌 질병의 진단에 따른 표준 처방”에 기술되어 있으며, 본 절에서는 중복을 피하기 위하여 재 수록을 생략함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

꿀벌 질병의 극복은 꿀벌이라는 생물체에 관심을 가진 면역학, 바이러스학, 유전체학, 약리학, 제약학 등 다양한 학문분야에서 오랜 연구를 통하여 하나씩 진보할 수 있을 것임.

근래 눈에 띄는 하나의 연구는 인간에 대한 HIV 제어 가능성을 보여준 사례이며, 독일 Wuerzburg대학과 Freiburg대학의 연구팀이 수행한 꿀벌 바이러스에 대한 정량적인 실험들임.

국내 토봉을 거의 괴멸시킨 kSBV도 우리의 무력함을 보여준 사례로서, 일개 바이러스의 제어도 꾸준한 연구로 그 병원체를 무력화하는 방법을 정밀하게 모색하여야 할 것이며, 범용성 화학물질로 천연적 치료에 주력하여서는 진보를 기대할 수 없을 것임.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술



경기대학교 양봉실습장 HQ: 본 과제에 수행된 곳임.

제 8 장 참고문헌

- 강민희, 김일욱, 유미선, 권순환, 윤병수. 2008. 꿀벌(*Apis mellifera* L.)에서 Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) 진단을 위한 PCR법의 개발. 한국양봉학회지. 23(1): 29-36.
- 김혜경, 최용수, 이명렬, 이만영, 이광길, 안난희. 2008. 국내 꿀벌에서의 Sacbrood Virus (SBV) 진단. Korean J. Apiculture. 23(2):103-109.
- 노지나(Ji-Na No) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , Van Phu Nugyen, 윤병수(Byoung Su Yoon) 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)법을 이용한 Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV)의 신속 진단법 개발. 한국양봉학회지. 25(4): 253-258
- 노지나(Ji-Na No) , 이보람(Bo-Ram Lee) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 윤병수(Byoung Su Yoon). 2011. IAPV내의 capsid protein gene의 검출을 위한 RT-LAMP 법의 개발. 한국양봉학회지. 26(2): 119-127
- 노지나, 유미선, 윤병수. 2010. Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) 검출을 위한 semi-nested PCR법의 개발. 한국양봉학회지. 25(2): 97-103.
- 박용하, 윤병수. 2012. 무공해 양봉 생산 시스템을 위한 꿀벌 프로바이오틱스 미생물 제제 개발. 농림특정과제 보고서, 농림수산부
- 백경찬, 양옥순, 정규희, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae*에 대한 다클론 항체 및 그 응용. 한국응용곤충학회지. 41(1):49-53.
- 백종희(Jong-Hui Baik), 이중구(Joong-Goo Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. 꿀벌 유충에 의한 약제 감수성 평가 방법. 한국양봉학회지. 27(4): 315-319
- 법률 7434호 가축전염병예방법 제2조(정의) 제2호 나목(제2종가축전염병).
- 양옥순, 윤병수. 2001. Metalloprotease 및 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*의 신속 PCR 검출법. 한국양봉학회지 16(1), 1-8.
- 유미선(Mi-Sun Yoo) , 이보람(Boram Lee), 노지나(Ji-Na No), Nguyen Van Phu , 윤병수(Byoung-Su Yoon) 2011. Black Queen Cell Virus 재조합 단백질의 발현. 한국양봉학회지. 26(4): 275-282
- 유미선, Kim Cuc Nguyen Thi, 김동수, 김일욱, 권순환, 윤병수. 2008. Israel Acute Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. 한국양봉학회지. 24(1):31-36.
- 유미선, 김일욱, 강민희, 한상훈, 윤병수. 2008. Nosema 진단을 위한 Real-time PCR 진단법의 개발, 한국양봉학회지. 23: 241-249.
- 유미선, 윤병수. 2009. 2009년 국내 꿀벌 질병의 발생. 한국양봉학회지. 24(4): 273-278.
- 유미선, 이동우, 김일욱, 김동수, 권순환, 임윤규, 윤병수. 2007. 한국산 꿀벌에서 Black Queen Cell Virus의 검출. 한국양봉학회지. 22(1): 43-52.
- 유미선, 조용호, 김일욱, 강민희, 권순환, 한상훈, 윤병수. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)을 이용한 꿀벌 바이러스 질병의 신속 검출법 개발. 한국양봉학회지. 23(3):185-190.
- 유미선, 최용수, 박용하, 윤병수. 2010. Chronic Vee Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. 한국양봉학회지 25(1):31-37.
- 윤병수. 2001. 꿀벌질병 제어를 위한 전국 발병 및 방제현황. 연구보고서, 한국양봉협회. p14-16.
- 윤병수. 2001a. 꿀벌의 전염병과 방제. In: 최신양봉경영(2001). 한국양봉과학연구소. p47-77.
- 윤병수. 2001b. 꿀벌질병 제어를 위한 전국 발병 및 방제현황. 연구보고서, 한국양봉협회. p14-16.
- 이도부, 양옥순, 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2004. Real-Time PCR을 이용한 미국 부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*의 신속진단. 한국양봉학회지 19(2), 97-108.
- 이명렬, 우순옥, 홍인표, 한상미, 최용수. 2011. RDA 인테러뱅 (꿀벌家の 가훈과 꿀벌산업의 가치). 농촌진흥청. 18호

- 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No) , Nguyen Van Phu , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 박용하(Yong-Ha Park) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 *Nosema ceranae* 검출법 개발. 한국양봉학회지 25(4): 267-274
- 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발. 한국양봉학회지. 26(4): 267-274
- 이보람(Boram Lee) , 노지나(Ji-Na No), 유미선(Mi-Sun Yoo) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발. 한국양봉학회지. 26(4): 267-274.
- 이보람(Boram Lee) , 유미선(Mi-Sun Yoo) , Nguyen Van Phu , 노지나(Ji-Na No) , 윤병수(Byoungsu Yoon) 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis*의 검출법 개발. 한국양봉학회지. 26(2) : 103-111
- 이보람(Boram Lee), Nguyen Van Phu, 유미선(Mi-Sun Yoo), 노지나(Ji-Na No), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. Sacbrood Virus와 Korean Sacbrood Virus의 구별 검출을 위한 PCR법 개발 한국양봉학회지 27(2): 129-135
- 이보람, 노지나, 유미선, 윤병수. 2011b. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 Sacbrood Virus (SBV)의 검출법 개발. Korean J. Apiculture. 26(4): 267-274.
- 이보람, 유미선, Nguyen Van Phu, 노지나, 윤병수. 2011a. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis*의 검출법 개발. Korean J. Apiculture. 26(2):103-111.
- 이중구(Joong-Goo Lee), 이보람(Boram Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발 한국양봉학회지. 27(4): 267-274
- 이중구(Joong-Goo Lee), 이보람(Boram Lee), 이순복(Soon-Bok Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2012. 디지털 영상자료를 이용한 꿀벌 개체수 측정의 새로운 방법 한국양봉학회지. 27(2): 149-154
- 이중구, 윤병수 . 2012. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발 한국양봉학회지 27(4) :267-274
- 이중구, 이보람, 이순복, 윤병수. 2012. 디지털 영상자료를 이용한 꿀벌 개체수 측정의 새로운 방법. 한국양봉학회지. 27(2) : 149-154.
- 이혜민, 유미선, 김을환, 이동우, 한상훈, 윤병수. 2006. 백목병 원인균 *Ascospheara apis*의 Quick Real-time PCR 검출법. Korean J. Apiculture. 21(2):107-112.
- 이혜민, 이도부, 한상훈, 남성희, 임윤규, 윤병수. 2005. Real-Time PCR을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis*의 신속 검출. Korean J. Apiculture. 20(2):109-116.
- 이혜민, 이도부, 한상훈, 이명렬, 윤병수. 2005. 한국산 꿀벌에서 Deformed Wing Virus의 발견과 Real-Time PCR 검출법의 확립. 한국양봉학회지. 20(2):85-94.
- 이혜민, 하정순, 조용호, 남성희, 윤병수. 2004. 꿀벌 진균성 질병의 신속 확인을 위한 *Ascospheara apis*, *Aspergillus flavus*의 PCR 검출법. Korean J. Apiculture. 19(2):139-148.
- 임희영(Hee-Young Lim), 이순복(Soon-Bok Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2013. 열화상 사진 자료에 기반한 꿀벌 봉군의 생사 진단 방법에 대한 고찰 한국양봉학회지. 28(1) : 57-62
- 임희영(Hee-young Lim), 이중구(Joong-Goo Lee), 윤병수(Byoungsu Yoon) 2013. RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰. 한국양봉학회지, 28(1): 63-73
- 장영덕. 2004. 국내의 양봉산업의 현황과 전망. 농협중앙회. 꿀벌사육시설과 관리. 1-32.
- 정우준. 2003. 넓치 비텔로제닌에 대한 단일클론항체. 제주대학교 대학원 석사학위논문.

- 조도행. 1994. 양봉 사계절 관리법. 오성출판사
- 조용호, 유미선, 김을환, 이동우, 김일옥, 강민희, 한상훈, 윤병수. 2007. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)을 이용한 꿀벌의 Black Queen Cell Virus(BQCV)신속 검출법의 개발. 한국양봉학회지 22(2): 139-146.
- 최승윤. 1973. 양봉 꿀벌과 벌통, 오성출판사
- 최승윤. 1989. 최신양봉학. 집현사. pp. 439.
- 최용수, 김혜경, 이명렬, 이만영, 이광길. 2008. Minus-strand-specific RT-PCR에 의한 Chronic Bee Paralysis Virus(CBPV) 진단. 한국양봉학회지 23(2):119-126.
- 최용수, 이명렬, 이만영. 2007. 국내 꿀벌에서의 Israel Acute Paralysis Virus (IAPV)진단. 한국양봉학회지. 22(2):159-165.
- 한상미, 이광길, 여주홍, 권해용, 우순옥, 백하주, 장영채. 2008. Staphylococcus aureus에 대한 국내산 꿀벌 독의 항균성분 분리. Korean J. Apiculture 23(2): 127-131.
- 한상훈, 임윤규, 윤병수. 2006. 분자생물학 연구방법론 III. 경기대학교 출판부.
- Allen, M. and B.V. Ball. 1996. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. Bee World 77: 141-162.
- Allen, M., Ball, B.V., 1995. Characterization and serological relationship of strain of kashmir bee virus. Ann. Appl. Biol. 126, 471 - 484.
- Anderson, D. L. & Gibbs, A. J., 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. J Gen Virol 69, 1617 - 1625.
- Anderson, D. L., 1993. Pathogens and queen bees. Australasian Beekeeper. 94: 292-296.
- Anderson, D.L. and H. Giacon. 1992. Reduced pollen collection by honeybee (Hymenoptera, Apidae) colonies infection with *Nosema apis* and sacbrood virus. J. Econ. Entomol. 85: 47-51.
- Anonymous., 2008. Bee mortality and bee surveillance in Europe. The EFSA Journal 154, 1-28.
- Antunez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., 2006. Honeybee viruses in Uruguay. J. Invertebr. Pathol. 93, 67 - 70.
- Atkins, E.L. Jr., Anderson, L.D., and Greywood, E. A., 1970. Research on the effect of pesticides on honeybees. Am. Bees. J. 110, 1968-1969.
- Bailey, L. 1964. The multiplication and spread of Sacbrood virus of bees. Annals of Applied Biology. 63:486-491.
- Bailey, L. 1975. Recent research on honey bee viruses. Bee World. 56(4):55-64.
- Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. Annu. rev. Entomol., 13:191-212.
- Bailey, L. and Ball, B.V., 1991. Honey bee pathology. Academic press, London
- Bailey, L., A.J. Gibbs and R.D. Woods. 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virology 21: 390-395.
- Bailey, L., A.J. Gibbs and R.D. Woods. 1968. The purification and properties of chronic bee-paralysis virus. J. Gen. Virol. 2: 251-260.
- Bailey, L., and Woods, R. D. 1977. Two more small RNA viruses from honey bee and further observation on sacbrood and acute bee paralysis viruses. J. Gen. Virol. 37: 175-182.
- Bailey, L., Ball, B. V. and J. N. Perry. 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. Ann. Appl. Biol. 103:13-20.
- Bailey, L., Fernando, E.F.W., 1972. Effects of sacbrood virus on adult honey bees. Ann. Appl. Biol. 72, 27 - 35.
- Bailey, L., Woods, R. D. 1977. Two more small RNA viruses from honeybee and further observation

- on sacbrood and acute bee paralysis viruses. *J. Gen. Virol.* 37: 175-182.
- Bakhiet, N., and Stahly, D.P. 1985. Ultrastructure of sporulating *Bacillus* larvae in a broth medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 690-692.
- Ball, B. V. and M. F. Allen. 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa Jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.* 113:237-244.
- Bamirick, J.F., 1964, Resistance to American foulbrood in honeybees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. *J. Insect Pathol.* 6, 284-304.
- Belloy, L., Imdorf, A., Fries, I., Forsgren, E., Berthoud, H., Kuhn, R., Charriere, J. (2007). Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honeybees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Apidologie* 38:136-140.
- Benjeddou, M., L. Leat, M. Allsopp and S. Favisson. 2001. Detection of Acute Bee Paralysis Virus and Black Queen Cell Virus from Honeybee by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 67:2384-2387.
- Berenyi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Koglbauer, H., Nowotny, N., 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2414 - 2420.
- Blanchard, P., Iscache, A.L., Olivier, V., Celle, O., Schurr, F., Ribiere, M., 2008. Improvement of RT-PCR detection of Chronic bee paralysis virus (CBPV) required by the description of genomic variability in French CBPV isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 97, 182 - 185.
- Blanchard, P., Ribiere, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L., Faucon, J.P., 2007. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of Chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *Journal of Virological Methods* 141, 7 - 13.
- Blomstrom, Anne-Lie, Mikhayil Hakhverdyan, Scott M.Reid, Juliet P. Dukes, Donald P. King, Sandor Belak and Mikael Berg. 2008. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *J. Virol. Methods* 147(1): 188-193.
- Boram Lee, Phu Van Nguyen, Soon-Bok Lee, Byoungsu Yoon 2012. Identification of Kakugo Virus in Honeybees from Korea. *한국양봉학회지.* 27(1): 45-49
- Boram Lee, Phu Van Nguyen, Soon-Bok Lee, Byoungsu Yoon. 2012. Identification of Kakugo Virus in Honeybees from Korea. *Journal of Apiculture.* 27(1) : 45-49
- Cacace, M. G., Landau, E. M., Ramsden, J. J., 1997. The Hofmeister; salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q. Rev. Biophys.* 30:241-277.
- Carver, J., and Walker, W.A., 1995. The role of nucleotides in human nutrition. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 6: 58-72.
- Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Hajimasaleh, W., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., Sithigorngul, P., 2010a. Improved sensitivity of Taura syndrome virus immunodetection with a monoclonal antibody against the recombinant VP2 capsid protein. *J Virol Methods* 163:433 - 439
- Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Srisuk, C., Sridulyakul, P., Sithigorngul, P., 2010b. Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein. *Aquaculture* 299, 15 - 20.
- Chakrabarti, Satadal and Manna, Buddhadeb. Effect of microsporidian infection on reproductive potentiality on mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) in different seasons. *Int. J. Indust. Entomol.* 17(1), 157-163, 2008

- Chen, Y.P., Higgins, J.A., Feldlaufer, M.F., 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 436–441.
- Choi, Y.S., M.Y. Lee, I.P. Hong, N.S. Kim, H.K. Kim, K.G. Lee, M.L. Lee. 2010. Occurrence of Sacbrood Virus in Korean Apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *J. Apiculture.* 25(3):187–191.
- Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P.L. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis and W. Ian Lipkin. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283–287.
- De jong D. 1977. A study of chalk brood disease of honey bee. Cornell University, Ithaca, USA, M. Sc. Thesis.
- De Miranda, J.R., M. Drebot, S. Tyler, M. Shen, C. Cameron, E., Stoltz, D.B. and S.M. Camazine. 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology.* 85: 2263–2270.
- Deans, A. S. C. 1940. Chalkbrood. *Bee World.* 21(4):46–51.
- Delaplane, K. (1998). Strictly for the hobbyist: European foulbrood and its control. *American Bee Journal* 138(10): 736–737.
- Diana L. Cox-Foster, Sean Conlan, Edward C. Holmes, Gustavo Palacios, Jay D. Evans, Nancy A. Moran, Phenix-Lan Quan, Thomas Briese, Mady Hornig, David M. Geiser, Vince Martinson, Dennis vanEngelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis and W. Ian Lipkin. 2007. A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science* 318: 283–287.
- Djordjevic, S. P., Noone, K., Smith, L, and Hornitzky, M. A. Z. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus plutonius*. *Journal of Apicultural Research* 37(3):165–174.
- Dunn, J.D. and J.J. Killion. 1998. Effect of mellitin on pituitary adrenal responsiveness to stress. *Acta. Endocrinol.* 119: 339–344.
- Eva Crane. 1997. The past and present importance of bee products to man. in *Bee products properties, applications, and therapy.* Plenum press. 1–8.
- Evans, J.D. and A.C. Hung. 2000. Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses. *Arch. Virol.* 145: 2015–2026.
- Forsgren, E., Lundhagen, A. C., Imdorf, A., and Fries, I. (2005). Distribution of *Melissococcus plutonius* in honeybee colonies with and without symptoms of European foulbrood. *Microbial Ecology* 50:369–374.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniasek, N. J.. 1996. *Nosema ceranae* n. Sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microspoidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology.* 32: 356–365.
- Fries, I., G. Ekbohm and E. Villumstad. 1984. *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *J. Apicult. Res.* 23: 102–105.

- Fries, I., R. Martín, A. Meana, P. García-Palencia and M. Higes. 2006. Natural infection of *Nosema ceranae* in European honey bees. *J. Apicult. Res.* 45: 230-233.
- Fujiyuki, T., E. Matsuzaka, T. Nakaoka, H. Takeuchi, A. Wakamoto, S. Ohka, K. Sekimizu, A. Nomoto and T. Kubo. 2009. Distribution of Kakugo Virus and Its Effects on the Gene Expression Profile in the Brain of the Worker Honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Virology* 83(22): 11560-11568.
- Fujiyuki, T., H. Takeuchi, M. Ono, S. Ohka, T. Sasaki, A. Nomoto and T. Kubo. 2004. Novel Insect Picorna-Like Virus Identified in the Brains of Aggressive Worker Honeybees. *Journal of Virology* 78(3): 1093-1100.
- Fujiyuki, T., H. Takeuchi, M. Ono, S. Ohka, T. Sasaki, A. Nomoto and T. Kubo. 2005. Kakugo virus from brains of aggressive worker honeybees. *Adv. Virus Res.* 65: 1-27.
- Genersch, E., 2005. Development of a rapid and sensitive RT-PCR method for the detection of deformed wing virus, a pathogen of the honeybee (*Apis mellifera*). *Vet. J.* 169(1): 121-123.
- Ghandehari, H., and Cappello, J., 1998. Genetic engineering of protein-based polymers: Potential in controlled drug delivery - Commentary. *Pharm Res*, 15, 813-815.
- Ghosh, R.C., B.V. Ball, M.M. Willcocks and M.J. Carter. 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *Journal of General Virology*. 80: 1541-1549.
- Ghosh, R.C., Ball, B.V., Willcocks, M.M., Carter, M.J., 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 6), 1541 - 1549.
- Ghosh, R.c., Ball, B.V., Willcocks, M.M., Carter, M.J.. 1999. the nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picornavirus. *J. Gen. Virol.* 80:1541-1549.
- Golemis, E., 2002. Protein-protein interaction: a molecular cloning manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 329-330.
- Govan, V.A., Allsopp, M.H., and Davison S., 1999. A PCR detection methods for rapid identification of *Paenibacillus* larvae, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2243-2245.
- Govan, V.A., Brozel, V., Allsopp, M.H. & Davison, S. (1998). A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus plutonius* in honeybee larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1983-1985
- Govan, V.A., N. Leat, M. Allsopp and S. Davison. 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-insecting RNA viruses. *Virology* 277: 457-463.
- Govan, V.A., N. Leat, M. Allsopp and S. Davison. 2000. Analysis of the complete genome sequence of acute bee paralysis virus shows that it belongs to the novel group of insect-insecting RNA viruses. *Virology* 277: 457-463.
- Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., Nowotny, N., 2007. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *J. Invertebr. Pathol.* 94, 222 - 225.
- Grabensteiner, E., Ritter, W., Carter, M.J., Davison, S., Pechhacker, H., Kolodziejek, J., Boecking, O., Derakhshifar, I., Moosbeckhofer, R., Licek, E., Nowotny, N., 2001. Sacbrood virus of the honeybee (*Apis mellifera*): rapid identification and phylogenetic analysis using reverse transcription-PCR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 93 - 104.
- Han, S.H., Choi, Y.S., Lee, M.L.. 2011. Development of Highly Specific Quantative Real-Time PCR

- Method for the Detection of Sacbrood Virus in Korean Honeybees, *Apis cerana*. Korean J. Apiculture. 26(3): 233-240.
- Harlow E., Lane, D., 1999. Using Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 495 p.
- Hatakeyama, Yoshinori., Shoji Hayasaka. A new method of pebrine inspection of silkworm egg using multiprimer PCR. Journal of Invertebrate Pathology. 82, 148-151, 2003
- Heath LAF and Gaze BM. 1987. Carbon dioxide activation of spores of the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. Journal of Apicultural Research 26(4):243-246.
- Hee-Young Lim, Byoung-Su Yoon 2013. Rapid and Sensitive detection of Deformed Wing Virus (DWW) in Honeybee using Ultra-rapid Real-time PCR. 한국양봉학회지, 28(2) : 121-129
- Hee-Young Lim, Joong-Goo Lee, Soon-Bok Lee, Ok-Min Lee , ByoungSu Yoon 2013. Application of Digital Infrared Thermal Imaging (DITI) as a Diagnostic Method for the Fate of Honeybee Colonies 한국양봉학회지, 28(2): 147-153
- Heskins, M., and Guillet, J. E., 1968. Solution properties of poly (Nisopropylacrylamide). J. Macromol. Sci. Chem. 2:1441-1455.
- Higes, M., Martin, R., Meana, A.. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. Journal of Invertebrate Pathology. 92: 93-95.
- Hornitzky, A.Z. and Smith, L. (1998). Procedures for the culture of *Melissococcus plutonius* from diseased brood and bulk honey samples. Journal of Apicultural Research 37, 293-294.
- Hornitzky, M. A. Z. and Smith, L. A. (1999). Sensitivity of Australian *Melissococcus plutonius* isolates to oxytetracycline hydrochloride. Australian Journal of Experimental Agriculture. 39:881-883.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Ethidium_bromide
- Huang, W.F., Jiang, J.H., Chen, Y.W., Wang, C.H.. 2005. Complete rRNA sequence of the *Nosema ceranae* from honeybee (*Apis mellifera*). <https://gra103.aca.ntu.edu.tw/gdoc/F90632004a.pdf> (Date: 2005-11-25).
- Joong-Goo Lee, Phu Van Nguyen, Baek Jun Soo, Hee-Young Lim 2013. Detection of Capsid Protein of Sacbrood Virus in Honeybee using Monoclonal Antibodies. 한국양봉학회지, 28(2): 113-120
- Joung, K. B. and Cote, J. C. (2002). Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. J Appl Microbiol 92, 97 - 108.
- Kakugo Virus의 검출법 개발. 경기대학교 기초과학논문집 제25권 제1호 : 33-43
- Kanbar, G., and Engels, W. (2003). Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa mites*. Parasitology Research 90:349-354.
- Klein , A. M., B. E. Vaissière, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. Biol. Sci. 274:303-313.
- Klein, A. M., B. E. Vaissiere, J. H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing land-scapes for world crops. Proc. R. Soc. B. 274:303-313.
- Klein, A.M., B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunnigham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crobs. Proc. R. Soc. B. 274: 303-313.

- Krupp, J.J., C. Kent, J.C. Billeter, R. Azanchi, A.K.C. So, J.A. Schonfeld, B.P. Smith, C. Lucas and J.D. Levine. 2008. Social experience modifies pheromone expression and mating behavior in male *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* 18: 1373-1383.
- Kukielka, D., Esperon, F., Higes, M., Sanchez-Vizcaino J. M., 2008. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *J. Virol. Methods.* 147: 275-281.
- Kukielka, D., Sanchez-Vizcaino, J.M., 2009. One-step real-time quantitative PCR assays for the detection and field study of Sacbrood honeybee and Acute bee paralysis viruses. *J. Virol. Methods* 161, 240 - 246.
- Lanzi, G., J.R. de Miranda, M.B. Boniotti, C.E. Cameron, A.Lavazza, L. Capucci, S.M. Camazine and C. Rossi.2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of virology* 80: 4998-5009.
- Larsson, R. 1986. Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Prog. Protistol.* 1: 325-390.
- Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassa M, and Bertoloni G., 2003. Rapid detection of *Paenibacillus* larvae from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol.*, 81(3), 195-201.
- Leat, N., B. Ball, B. Govan and S. Davison. 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology* 81: 2111-2119.
- Leat, N., Ball, B., Govan, V., Davision, S., 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.* 81:2111-2119.
- Levin, M.D. 1983. Value of bee pollination to U.S. Agriculture. *Bull. Ent. Soc. Am.* 29: 50-51
- Levin, M.D. 1983. Value of bee pollination to U.S. Agriculture. *Bull. Ent. Soc. Am.* 29: 50-51.
- Li, B., Alonso, D. O. V., Bennion, B. J., Daggett, V., 2001a. Hydrophobic hydration is an important source of elasticity in elastin-based biopolymers. *J. Am. Chem. Soc.* 123:11991-11998.
- Li, B., Alonso, D. O. V., Daggett, V., 2001b. The molecular basis for the inverse temperature transition of elastin. *J. Mol. Biol.* 305:581-592.
- Luan, C. H., and Urry, D. W., 1991. Solvent deuteration enhancement of hydrophobicity:DSC study of the inverse temperature transition of elastin-based polypeptides. *J. Phys. Chem.* 95:7896-7900.
- Ma, M., C. Ma, M. Li, S. Wang, S. Yang and S. Wang. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. *J. Virol. Methods.* 176:115-119
- Maassen, A. 1913. Weitere Mitteilungen über der seuchenhaften Brut-krankheiten der Bienen [Further communication on the epidemic brood disease of bees]. *Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land-und Forstwirtschaft.* 14:48-58.
- Maori, E., L. Shai, M.K. Rita, G. Uulia, P. Yuval, E. Orit, T. Edna and S. Ilan. 2007. Isolation and characterization of Israel acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intraand inter-species recombination. *Journal of General Virology* 88: 3428-3438.
- Mariano Higes, Pilar Garcia-Palencia, Raquel Martin-Hernandez, Aranzazu Meana. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology.* 94: 211-217.
- Martin, S.J. 2001. The role of *Varroa* and Viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a

- modeling approach, *J. Appl. Ecol.* 38: 1082-1093.
- Maurizio A. 1934. *Über die Kaltbrut(Pericystis-MyKose) der Bienen.* *Archive fur Bienenkunde* 15:165-193.
- McKee, B. A., Goodman, R. D., and Hornitzky, M. A. (2004). The transmission of European foulbrood (*Melissococcusplutonius*) to artificially reared honeybee larvae(*Apismellifera*).*Journal of Apicultural Research*43(3):93-100.
- Meyer, D. D., Trbbic-Carlson, K., Chilkoti, A., 2001. Protein purification by fusion with an environmentally responsive elastin-like polypeptide: Effect of polypeptide length on the purification of thioredox in. *Biothcnol. Prog.* 17: 220-728.
- Meyer, D. E. and Chikoti, A., 1999. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally responsive polypeptides. *Nat. Biotechnol.* 17:1112-1115.
- Meyer, D. E., Chilkoti, A., 2002. Genetically encoded synthesis of proteinbased polymers with precisely specified molecular weight and sequence by recursive directional ligation: examples from the elastin-like polypeptide system. *Biomacromolecules.* 3:357-367.
- Mingxiao, M., Chen, M., Mng, L., Shuquan, W., Song, Y., Shude, W., 2012. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. *Journal of Virological Methods* 176, 115 - 119.
- Mi-Sun Yoo, Boram Lee, Phu Van Nguyen, Byoung-Su Yoon 2012. Purification of Recombinant Protein of Black Queen Cell Virus 한국양봉학회지. 27(1): 59-64
- Mi-sun Yoo, Kim Cuc Nguyen Thi, Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Soon-Hwan Kwon, Byoung-Su Yoon 2011. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 179(1) : 195-200
- Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus 한국양봉학회지. 26(3): 203-208
- Mi-Sun Yoo, Van Phu Nguyen , Ji-Na No , Bo-Ram Lee , Yong-Ha Park , Byoung-Su Yoon 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for the Detection of Nosema 한국양봉학회지. 26(1): 21-27
- Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S., and Doi, R. H. (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75(1): 95-96.
- Morse, R. A. and N. W. Calderone. 2000. The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Cult.* 128:1-15.
- Morse, R. and N.W. Calderone. 2000. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Cult.* 128: 1-15.
- Morse, R.A. 1978. Introduction. pp. 13-22. In *Honey bee pests, predators, and diseases*, ed. by R. A. Morse. 430p. Cornell Univ., Ithaca.
- Motoki G., Eiichi H., Atsuo O., Akio N., Ken H. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*, Vol. 46, No. 3, pp. 167 - 172.
- Nagamine K., T. Hase and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes.* 16(3), 223-229.
- Nagamine, K., T. Hase and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* 16(3): 223-229.

- Nagapudi, K., Brinkman, W. T., Leisen, J. E., Huang, L., McMillan, R. A., Apkarian, R. P., Conticello, V. P., Chaikof, E. L., 2002. Photomediated solidstate cross-linking of an elastin-mimetic recombinant protein polymer. *Macromolecules*. 35:1730-1737.
- Nguyen Thi, K.C., M.S. Yoo, M.H. Kang, S.H. Han, C.H. Yun, B.S. Yoon. 2009. Development of Real-time PCR Assay for the Detection of Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Apiculture*. 24(1): 15-21.
- Nguyen Thi, K.C., M.S. Yoo, I.W. Kim, M.H. Kang, S.H. Han, B.S. Yoon. 2008. Development of PCR Detection Method for Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Apiculture*. 23(3): 177-184.
- Nguyen Thi, K.C., Yoo, M.S., Kang, M.H., Han, S.H., Yoon, Yun, C.H., B.S.. 2009. Development of Real-time PCR Assay for the Detection of Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Apiculture*. 24(1): 15-21.
- Nguyen Thi, K.C., Yoo, M.S., Kim, I.W., Kang, M.H., Han, S.H., Yoon, B.S.. 2008. Development of PCR Detection Method for Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Apiculture*. 23(3): 177-184.
- Nguyen V.P, Han H.H and Yoon B.S (2011). Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacillus* larvae. *Journal of Apiculture* 26(3) : 213~220
- Nguyen, T.K.C., Yoo, M.S., Kang, M.H., Han, S.H., Yun, C.H., Yoon, B.S., 2009. Development of real time PCR assay for the detection of Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Korean J. Apic.* 24, 15 - 21.
- Nguyen, V.P., Ji-Na N, Han, S.H., Kwon, S.H., Yoon, B.S Park Y.H., 2010. Development of Sacbrood Virus-specific PCR detection based on stable Capsid Protein Sequence. *Korean J. Apiculture* 25(2) : 115~122.
- No Ji-Na, Nguyen Van Phu, Mi-Sun Yoo, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. 2010. Simple and Rapid Method for Detection of Deformed Wing Virus (DWV) by Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Kor. J. Apicul.* 25(3):211-216.
- Norihito T., Yasuyoshi M., Hidetoshi K., Tsugunori N., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols* Vol.3No.5, 877-882.
- Notomi T., Okayama, Watanabe, Amino N., Hase T., 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, E63.
- Notomi Tsugunori, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko watanabe, Nobuyuki Amino and Tetsu Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12), e63.
- Notomi Tsugunori. 2007. Loop-mediated isothermal amplification. *Nippon Rincho*. 65(5), 957-961.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28: no. 12 e63.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 28(12):e63
- Ohori Akira, Shigeo Endo, Ayako Sano, Koji Yokoyama, Kyoko Yarita, Masashi Yamaguchi, Katsuhiko Kamei, Makoto Miyaji, Kazuko Nishimura. 2006. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method. *Vet Microbiol.* 114(3-4),

359-365.

- Ohuri, Akira, Shigeo Endo, Ayako Sano, Koji Yokoyama, Kyoko Yarita, Masashi Yamaguchi, Katsuhiko Kamei, Makoto Miyaji and Kazuko Nishimura. 2006. Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Vet Microbiol.* 114(3-4): 359-365.
- Phu Van Nguyen , Ji-Na No , Bo-Ram Lee , Mi-Sun Yoo , Byoung-Su Yoon. 2011. Detection and Quantification of Major Royal Jelly Protein 1 in Honeybees by ELISA using a Monoclonal Antibody. *한국양봉학회지* 26(1): 71-77
- Phu Van Nguyen, Boram Lee, Byoung-Su Yoon 2012. Over-expression and Purification of Capsid Protein of Sacbrood Virus in *E. coli* *한국양봉학회지*.27(3) : 209-214
- Phu Van Nguyen, Boram Lee, Mi-Sun Yoo, Byoung-Su Yoon 2012. Development and Clinical Validation of a DNA Gyrase Subunit B Gene Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of *Melissococcus plutonius*. *한국양봉학회지*. 27(1): 51-58
- Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Byoung-Su Yoon 2011. Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacillus larvae* *한국양봉학회지*. 26(3): 213-220
- Rana, B.S., I.D. Garg, S.M.P. Khurana, L.R. Verma and H.O. Agrawal. 1986. Thai Sacbrood Virus of honeybees (*Apis cerana indica* F) in Northwest Himalayas. *Indian. J. Virol.* 2:127-131
- Ribie're, M., C. Triboulot, L. Mathieu, C. Aurie'res, J. P. Faucon and M. Pépin. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie* 33: 339-351.
- Ribiere, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurieres, C., Faucon, J. P., Pepin, M. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie*. 33:339-351.
- Roetschi, A., Berthoud, H., Kuhn, R., Imdorf, A. (2008). Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*39:362-371.
- S. Subharat, P. R. Wilson, C. Heuer and J. M. Collins (2011). Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer. *JVETDiagnInvest*, XX(X) 1 - 10.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis. T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sang-Hoon Han, Yong-Soo Choi , Myeong-Lyeol Lee 2011. Development of Highly Specific Quantative Real-Time PCR Method for the Detection of Sacbrood Virus in Korean Honeybees, *Apis cerana* *한국양봉학회지*. 26(3): 233-240
- Sanpa, S., Chantawannakul, P., 2009. Survey of six bee viruses using RT-PCR in North- 299 ern Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology* 100, 116 - 119.
- Schild, H. G., Tirrell, D. A., 1990. Microcalorimetric detection of lower critical solution temperatures in aqueous polymer solutions. *J. Phys. Chem.* 94:4352-4356.
- Seibert, C.H., Borsa, M., Rosa, R.D., Cargnin-Ferreira, E., Pereira, A.M., Grisard, E.C., Zanetti, C.R., Pinto, A.R., 2010. Detection of major capsid protein of infectious myonecrosis virus in shrimps using monoclonal anti - bodies. *J Virol Methods* 169(1):169-75.
- Shimanuki, H. and Knox, D. A (2000). *Diagnosis of honey bee diseases*. USDA-ARS Agriculture Handbook Number 690 : 61p.

- Sithigorngul, P., Hajimasalaeh, W., Longyant, S., Sridulyakul, P., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., 2009. Simple immunoblot and immunohistochemical detection of *Penaeus stylirostris* densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods* 162, 126 – 132.
- Sithigorngul, P., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulyakul, P., Longyant, S., 2011. Simultaneous and rapid detection of white spot syndrome virus and yellow head virus infection in shrimp with a dual immunochromatographic strip test. *J Virol Methods* 173:85 – 91.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD (2006). Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol* 6:95.
- Sneath, P.H.A., and Mair, N.S., 1986. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, Vol. 2 Williams and Wilkinss. 1070–1071.
- Stoltz, D., Shen, X.-R., Boggis, C. & Sisson, G. 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Api. Res.* 34:153–160.
- Thompson, H. M. and Brown, M. A. (2001). Is contact colony treatment with antibiotics an effective control for European foulbrood? *Bee World* 82(3): 130–138.
- Tomkies, V, Flint, J., Johnson, G., Ruth, W., Wilkins, S., Danks, C., Watkins, M., Cuthbertson, G., Carpana, E., Marris, G., Budge, G., and Brown, M. (2009). Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie* 40: 63–72.
- Topley, E., Davison, S., Leat, N., Benjeddou, M., 2005. Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single multiplex reverse transcriptase PCR. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 763–767.
- Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, Tetsu Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research.* 28: no. 12
- Tsugunori, N. 2007. Loop-mediated isothermal amplification. *Nippon Rinsh.* 65: 957–961.
- Urry, D. W., 1992. Free energy transduction in polypeptides and proteins based on inverse temperature transition. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 57:23–57
- Urry, D. W., 1997. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers. *J. Phys. Chem. B.* 101:11007–11028.
- Urry, D. W., Luan, C. H., Parker, T. M., Gowda, D. C., Parasad, K. U., Reid, M. C., Safavy, A., 1991. Temperature of polypeptide inverse temperature transition depends on mean residue hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.* 113:4346–4348.
- Urry, D. W., Peng, S., Parker T., 1993. Delineation of electrostatic- and hydrophobic-induced pKa shifts in polypentapeptides: the glutamic acid residue. *J Am Chem Soc.* 115:7509–7510.
- van Engelsdorp D., R. Underwood, D. Caron, J. Hayes. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. *American Bee* 147:559–603.
- van Engelsdorp, D., R. Underwood, D. Caron and J. Hayes. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. *American Bee* 147: 559–603.
- Vijay, A. K. B. G; Lenie, D; Sophie, B; Didier, R and Bernard, L. S (2009). Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 155, 2333 – 2341

- Waite, R. J., Brown, M. A., Thompson, H. M., Bew, M. H. (2003a). Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie* 34: 569-575.
- Waite, R., Jackson, S., and Thompson, H. (2003b). Preliminary investigations into possible resistance to oxytetracycline in *Melissococcus plutonius*, a pathogen of honeybee larvae. *Letters in Applied Microbiology* 36:20-24.
- Wansika Kiatpathomchai, Wansadaj Jareonram, Sarawut Jitrapakdee, T.W. Flegel. 2007. Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 146(1-2), 125-128.
- Weiss, L.M. and C.R. Vossbrinck. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, L.M. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 129-171.
- Wilkins, S.; Brown, M. A.; Cuthbertson, A. G. S., (2007). The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest Manag. Sci.*, 63 (11), 1062-1068
- Williams, M.R., D.A.G. Maxwell and R.L. Spooner. 1975. Quantitative studies on bovine immunoglobulins, normal plasma levels of IgG2, IgG1, IgM and IgA. *Res. Vet. Sci.*, 18: 314-321.
- Wilson M.B. and Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies., North. holland. biomedical., 1978
- Winston, M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*, Harvard University Press, Cambridge, London, UK.
- Xu Hai-Dong, Juan Feng, Zhi-Xun Guo, You-Jun Ou, Jiang-Yong Wang. 2009. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*. 163(1), 123-128.
- Xu, H.D., J.F. Zhi-Xun Guo, Y.J. Ou and J.Y. Wang. 2009. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 163(1): 123-128.
- Yan, X., Chen, J., Han, R., 2009. Detection of Chinese sacbrood virus (CSBV) in *Apis 301 cerana* by RT-PCR method. *Sociobiology* 53, 687 - 694.
- Yang, J.L., Yang, R., Shen, K.F., Peng, X.W., Xiong, T., Liu, Z.H., 2012. Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virol J.* 9:47.
- Yang, J.L; Yang, R; Shen, K.F; Peng, X.W; Xiong, T and Liu, Z.H., (2012). Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virology Journal*, 9:47
- Yoo Mi-Sun, Ji-Na No, Van Phu Nguyen, Yong Soo Choi, Yong-Ha Park, Byoung-Su Yoon. 2010. Development of Ultra-rapid Real-Time PCR Method for the detection of Chronic Bee Paralysis Virus. *J. Apiculture*. 25(3):193-199.
- Yoo, M.S, Noh, J.H., Yoon, B.S, Reddy, K.E, Kweon, C.H, Jung, S.C, Kang, S.W., 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *J Virol Methods* 186(1-2):147-151.
- Yoo, M.S., K.C. Nguyen Thia, P.V. Nguyen, S.H. Han, S.H. Kwon, B.S. Yoon. 2012. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 179:195 - 200.
- Yoo, M.S., Lee, B.R., No, J.N., Nguyen, V.P., Yoon, B.S., 2011. Expression of Recombinant Protein of Black Queen Cell Virus Korean. *Korean J. Apiculture*. 26(4):275-282.

- Yoo, M.S., Nguyen, T.K.C., Nguyen, V.P., Han, S.H., Kwon, S.H., Yoon, B.S., 2012. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 179, 195 - 200.
- Yoshiteru Aoi, Mariko Hosogai, Satoshi Tsuneda. 2006. Real-time quantitative LAMP(loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J Biotechnol.* 125(4), 484-491.
- Yoshiteru, Aoi, Mariko Hosogai and Satoshi Tsuneda. 2006. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.* 125(4): 484-491.
- Yun, Y.J. et al. (2005) Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* in joint biopsy specimens by rpoB PCR cloning and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 43, 174 - 178
- Zhang Fengying, Lingbo Ma, Xhaoli Xu, Junbin Zheng, Yanhong Shi, Yanan Lu, Yuping Miao. 2009. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi*(Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae.* 8(6), 839-842.
- Zhang, Fengying, Lingbo Ma, Xhaoli Xu, Junbin Zheng, Yanhong Shi, Yanan Lu, Yuping Miao. 2009. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae.* 8(6): 839-842.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품 부에서 시행한 첨단기술개발사업의 연구결과임을 밝혀 야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발 표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발				
	(영문)Development of total diagnosis system for the diseases in honeybee				
주관연구기관	경기대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 경기대학교 생명과학과	
참 여 기 업				(성명) 윤 병 수	
총연구개발비 (390,000천원)	계	390,000천원	총 연 구 기 간	2010. 7. 1. ~ 2013. 6. 30.	
	정부출연 연구개발비	390,000천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	15
	기업부담금	0		내부인원	7
	연구기관부담금	0		외부인원	8
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>목표 : 국내 발병이 확인된 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단시스템을 확립</p> <p>내용 1) 꿀벌 주요 질병에 대하여 각 특이 병원체의 신속검색을 위한 실시간 정량 PCR법을 신규 또는 개선 개발함. 2) 꿀벌 주요 질병의 병원체에 대하여, 재조합 DNA방법 등에 의하여 각 특이 항원단백질을 생산하고, 이어 하이브리도마법을 이용한 특이항체를 생산하고자 함. 3) 특이 항체를 이용 ELISA법에 의한 면역학적 진단법 및 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트를 개발함. 4) 질병시료로부터 병원체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 일괄 표준 실험법을 확립함. 5) 유효 약제, 예방 요령 등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하여, 진단결과와 함께 표준 처방 지침을 통보할 수 있도록 하는 것을 목표로 한다.</p> <p>○ 연구결과</p> <p>국내 발병이 확인된 15종의 꿀벌 주요 질병에 대한 총체적 진단시스템을 확립하였음. 해당되는 질병은미국부저병 (AFB), 유럽부저병 (EFB), 백목병 (Chalkbrood), 노제마병 (Nosema Disease) 2종, 낭충봉아부패병 (Sacbrood) 및 최근 국내의 토종벌을 거의 괴멸수준으로 피해를 입힌 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 (Korean Sacbrood Virus: kSBV), 만성마비병 (Chronic bee paralysis virus), Black queen cell virus, 날개불구병 (Deformed wing virus) 및 Israel acute paralysis virus 그리고 본 연구를 통하여 국내 발병이 확인된 Kakugo virus 등이다. 이들 모두에 대하여 최소 1가지 이상의 진단법을 확립하였으며, 이중 신규 개발된 진단법은, 초고속 PCR 법이 8종, PCR 법이 9종, LAMP법이 8종, Rapid kit가 4종이었다. 또한 꿀벌의 질병시료 애벌레 및 성충 으로부터 DNA 및 RNA 의 genome 을 갖는 병원체를 일괄적으로 쉽게 분리하고 유전자검사 및 항원검사를 수행할 수 있는 일괄 진단실험법을 제정 하였으며, 진단결과에 따라 유효 약제를 추천할 수 있는 표준 처방을 또한 제시하였다.</p> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <p>본 연구의 성과물은 DNA 및 RNA genome을 갖는 병원체들에 대한 유전자 검사의 키트로서, 우선, LAMP키트들은 (주)GeneClone과 협의를 거쳐 7종의 시제품을 생산하였으며 다른 병원체에 대한 LAMP kit 들과 초고속PCR kit 및 일반 PCR kit들도 그 상품화를 협의 중에 있다. 한편, 특이 항체를 사용하는 면역학적 키트 (Rapid kit들은 4종의 주요 질병에 대하여 현재 (주)Bionote와 제품화 실험을 진행 중이며, 다른 병원체에 대한 Rapid kit들도 그 상품화를 협의 하고 있다. 아울러, 꿀벌의 질병시료로부터 보다 쉽게 DNA 및 RNA genome을 분리하기 위한 꿀벌질병시료 전문 핵산 분리 kit도 (주)BioSolution과 협의 중에 있다.</p>					

[별첨 2]

자체평가 의견서

연구개발분야	F0306 곤충자원/병리	과제구분	<input type="checkbox"/> 지정공모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	
연구과제명	꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발				
주관연구기관	경기대학교				
연구담당자	주관연구책임자	윤 병 수			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	제주대학교	성 명	손원근
		기관(부서)	한국양봉협회	성 명	전정우
		기관(부서)		성 명	
		기관(부서)		성 명	
연구기간	총 기 간	2010.07.01 - 2013.06.30	당해년도기간	2012.07.01 - 2013.06.30	
연구비(천원)	총 규 모	390,000,000원	당해년도규모	130,000,000원	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행
 계획대로 진행
 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음
 어느 정도 얻음
 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음
 현재로서 불투명함
 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

- 공헌했음 현재로서 불투명함 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

- 기술료 등 수익 수 익 :
 기업 등에의 기술이전 기업명 : (주)진클론, (주)바이오노트
 기술지도 등 기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

- 국내출원/등록 출원 2 건, 등록 2 건
 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재·발표 등

- 국내 학술지 게재 12 건
 해외 학술지 게재 13 건
 국내 학·협회 발표 건
 국내 세미나 발표 건
 기 타 건

5-4 인력양성효과

- 석 사 8 명
 박 사 2 명
 기 타 10 명

5-5 수상 등

- 있 다 상 명칭 및 일시 :
 없 다

5-6 마스크롬 등의 PR

- 있 다 건
 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다 약간 감소되었다 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

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

- 없다 약간 조정필요 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

꿀벌 질병에 대한 검사 키트의 생산은 기업에 기술이전하여 상품화를 시켜야 하나, 현재 다수의 전문 기업은 꿀벌질병 진단키트의 상업성에 대하여 의문을 표시하며 주저하고 있음. 본 과제에서 개발된 키트들의 실질적 수요처는 국립수의과학검역검사본부 등 관공소 (예, 각 시도 가축위생시험소), 그리고 현장의 양봉농가들이나, 현재의 꿀벌질병 진단에 대한 정책은 상기 키트들을 상업적으로 제조, 생산 및 판매를 하여야 하는 전문기업들에게 시장이 과연 형성될 것인지를 걱정할 정도로 열악함.

현재 꿀벌질병에 대하여 투입되는 국가재정은 연 30억원, 지방재정 연 30억원으로, 그 합이 연 60억 원에 달하여 적지 않은 수준이나, 이 재원은 모두 꿀벌질병에 대한 약제의 구입비로만 투입되고 있으며(구입후 무상분배), 정작 꿀벌질병 진단에 대한 비용은 거의 없는 것이 실정임(꿀벌약제의 총 수요는 양봉인의 구입을 포함하면 200억원/년으로 추산됨).

따라서 현재까지 꿀벌질병의 제어는 양봉인의 자가진단에만 거의 의존하고 있으며, 이런 자가진단 및 약제의 무상분배 정책은 지난 10여년 이래 지속되어 왔고, 또한 많은 국가 및 지방 재원을 투입하여 왔으나(총액은 이미 수백억원 수준), 꿀벌질병에 대한 약제의 오용 및 남용으로 국내양봉의 질병 환경은 이전 보다 심각한 수준에 이르게 하였음(예; 근래 kSBV에 의한 국내 토종벌의 괴멸).

한편, 진단키트를 생산하는 전문기업 측의 주장은 1종 진단키트 당 년 1억원의 매출만 기대할 수 있어도 보다 좋은 제품을 제조, 판매하여 앞날을, 즉, 국제 시장을 기대해 보겠다고 하고 있으나, 진단키트 시장 자체가 형성되지 않은 현시점에서, 이 시장의 부재는 꿀벌질병 진단키트의 상품화를 막는 가장 중요한 원인이 되고 있음.

전기한 바와 같이 국가 및 지방재정에서 투입되는 꿀벌질병에 대한 약제 구입비(구입후 무상분배)는 지난 수년간 계속 년 60억원에 이르고 있으며, 이 중 일부만이라도 국내 꿀벌 주요질병(현재 12종)을 대상으로 한 질병진단에 사용하여도, 국내 전문기업으로 하여금 시장진출의 용기를 갖게 할 것임은 물론, 국내 꿀벌질병제어에 새로운 도약을 이루게 될 것이다.

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족 보통 미흡

(근거 : _____)

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

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분 보통 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분 보통 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분 고려 중 중단

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

- 확대 동일 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능 수년 내 기업화 가능 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	경기대학교	교 수	윤 병 수 
참여기업대표			(인)

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	곤충자원 병리	
연구과제명	꿀벌 질병 종합 진단 시스템의 개발			
주관연구기관	경 기 대 학 교	주관연구책임자	윤 병 수	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	390,000			390,000
연구개발기간	2010.07.01 - 2013.06.30			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input checked="" type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 꿀벌 주요 질병에 대하여 각 특이 병인체의 신속검색을 위한 실시간 정량 PCR법을 신규 개발	각 특이 병인체의 신속검색을 위한 실시간 정량 PCR법, 초고속 PCR법, LAMP법들을 신규 및 개선 개발하였음.
② 꿀벌 주요 질병의 병인체에 대하여, 재조합 DNA방법 등에 의하여 각 특이 항원단백질 생산	꿀벌 주요 질병의 병인체에 대하여, 재조합 DNA방법 등에 의하여 각 특이 항원단백질을 생산하였음
③ 특이 항원을 이용하여 생산된 특이 항체로 ELISA법에 의한 면역학적 진단법 및 양봉 현장에서 꿀벌 질병을 쉽게 검색해 낼 수 있는 래피드 키트	각 특이 항원단백질 등을 사용하여, 특이 항체를 생산하였으며, 면역학적 진단법, 래피드 키트들을 제작하였음
④ 질병시료로부터 병인체 확인에 의한 진단을 목표로, 대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 일괄 표준 실험법을 확립함.	대량의 검체를 동시에 처리할 수 있는 일괄 표준 실험법을 확립하였음.
⑤ 유효 약제, 예방 요령등을 제시한 표준 처방법을 신규 제정하여, 진단결과와 함께 표준 처방 지침을 통보할 수 있도록 하는 것을 목표로 한다.	표준 처방법을 신규 제정하여, 진단결과와 함께 표준 처방 지침을 통보할 수 있도록 하였음

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	DNA 병원체의 검사를 위한 초고속 PCR 기술
②	RNA병원체의 검사를 위한 초고속 Reverse Transcription PCR 기술
③	DNA 및 RNA 병원체의 검사를 위한 LAMP 및 RT-LAMP 기술
·	
·	
·	

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술	v					v	v			
③의 기술		v				v	v			
·										
·										

* 각 해당란에 v 표시

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	본 기술의 결과는 바로 상품화에 들어갈 것이며 타 병원체에 대한 확대 적용을 모색할 것임.
②의 기술	본 기술의 결과는 바로 상품화에 들어갈 것이며 타 병원체에 대한 확대 적용을 모색할 것임.
③의 기술	본 기술의 결과는 바로 상품화에 들어갈 것이며 타 병원체에 대한 확대 적용을 모색할 것임.
·	
·	

6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	꿀벌질병 검색용 초고속 PCR kit 및 초고속 RT PCR (set)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	- 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월 이내	실용화예상시기 ³⁾	2014년 2월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	현재 꿀벌 진단용 kit들의 시장 규모는 가늠하기 어려운 이유로, 기술의 이전은 상업용 kit의 총 매출 중 일정 %를 기술료로 정함		

핵심기술명 ¹⁾	꿀벌질병 검색용 LAMP kit (set)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	- 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월 이내	실용화예상시기 ³⁾	2014년 2월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	현재 꿀벌 진단용 kit들의 시장 규모는 가늠하기 어려운 이유로, 기술의 이전은 상업용 kit의 총 매출 중 일정 %를 기술료로 정함		

핵심기술명 ¹⁾	꿀벌질병 검색용 Rapid kit (set)		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	6개월 이내	실용화예상시기 ³⁾	2014년 2월
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	현재 꿀벌 진단용 kit들의 시장 규모는 가늠하기 어려운 이유로, 기술의 이전은 상업용 kit의 총 매출 중 일정 %를 기술료로 정함		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
 통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)