

발간등록번호

11-1543000-001175-01

꿀벌의 주요현안 감염성 질병에 대한 통합 방제기술 개발
(Development of total control techniques against
major infectious diseases in honey bee)

경기대학교 산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “꿀벌의 주요 현안 감염성 질병에 대한 통합 방제기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “항바이러스제, 항세균제, 항진균제 선발 및 평가를 위한 다중 검사법의 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2016 년 1 월 8 일

주관연구기관명 : 경기대학교산학협력단

주관연구책임자 : 윤 병 수

1세부연구책임자 : 윤 병 수

2세부연구책임자 : 김 재 수

3세부연구책임자 : 길 성 호

1협동연구기관명 : 농림축산검역본부

1협동연구책임자 : 강 승 원

2협동연구기관명 : 국립농업과학원

2협동연구책임자 : 최 용 수

3협동연구기관명 : 제주대학교산학협력단

3협동연구책임자 : 임 윤 규

4협동연구기관명 : 서울대학교산학협력단

4협동연구책임자 : 채 찬 회

5협동연구기관명 : (주)비센

5협동연구책임자 : 박 진 규

6협동연구기관명 : (주)녹십자수의약품

6협동연구책임자 : 김 중 만

7협동연구기관명 : 안동대학교산학협력단

7협동연구책임자 : 정 철 의

요 약 문

I. 제 목

꿀벌의 주요 현안 감염성 질병에 대한 통합 방제기술 개발

II. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구의 목표는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다.

이에 대하여, 먼저 바이러스 질병의 전파 차단 방법을 제시할 수 있었으며, 3종의 주요 꿀벌에 대하여 9종이상의 유효한 치료제를 제시할 수 있었고, 3종의 병원체를 각기 정량적으로 검출해 낼 수 있는, 핵산 기반 신속 진단법들, 현장용 면역클로마토마토그래피법을 개발할 수 있었다. 아울러 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 시스템과 꿀벌유래 세포주의 개발에서도 우수한 초대 배양의 조건을 확립하는 등 소기의 목적을 달성할 수 있었다.

정량적인 목표 대비 실적은 아래표와 같다.

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용홍보		기타 (유전자원등록, 타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	9	6	6	4	0	0	0	0	0	13	11	0	8	0	2	8	11
연구기간 내 달성실적	15	2	6	4	0	0	0	0	0	17	28	79	10	3	2	8	18
달성율 (%)	167	33	100	100	0	0	0	0	0	131	255	100	125	100	100	100	100

III. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다. 이 목표를 달성하기 위하여, 상기 꿀벌 질병의 치료 및 방제를 위한 효과적인 꿀벌약품들을 탐색 및 개발하고, 꿀벌에 무분별하게 사용되어온 약품 등(미등록 약품 포함)에 대한 표준사용법을 개발하고, 유효한 면역증강 물질을 탐색 및 개발하고자 하였다.

본 연구는 2011년 이래 낭충봉아부패병(korean Sacbrood virus)에 의한 국내 토종벌의 전멸위

기에 기인하여 촉발된 바가 크며, 종전 꿀벌질병제어에 대한 정부의 정책이, 다만 양봉인에게 치료약제를 무상 지급하여 온 것에 대하여 개선의 방향을 찾고자 하는 의미도 있을 것이다. 꿀벌의 질병은 사실 정부의 통합적 제어 노력이 미약하였고, 바이러스 질병연구의 주된 도구인 꿀벌 유래 세포주도 확립되지 않은 등 연구의 기반도 매우 미약한 수준에 머물러 있었다.

본 과제는 곤충학, 생물학, 수의학의 제 분야에서 연구자들이 합심하여 꿀벌질병에 대한 미약한 연구기반을 보다 높이는데 의의가 있다고 하겠다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병, 부저병, 및 석고병을 대상으로 하며, 해당 병원체는 각각 바이러스인 SBV, 세균인 *Paenibacillus larvae*, 진균인 *Ascosphaera apis* 이다.

이들 3종의 병원체 그리고 질병에 대한 통합 방제시스템을 구축하기 위하여, 1) 주요 감염 경로에 대한 연구, 2) 유효한 치료제의 발굴, 3) 각 병원체를 정량적으로 검출할 수 있는 검출방법, 4) 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 검색시스템 개발, 그리고 5) 차후 바이러스 질병 연구에 큰 도구가 될 꿀벌유래 세포주의 구축 등을 연구 개발하였으며, 농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼도 개발하고자 하였다.

V. 연구개발결과

먼저 바이러스 질병의 전파 차단 방법의 방법을 꿀벌응애 등 해충의 방제 방법을 제시할 수 있었으며, kSBV, *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis*의 주요 꿀벌질병에 대하여 각기 3종 이상씩의 현 시점에서 유효한 치료제를 제시할 수 있었고, 다수의 신약 후보 물질들을 발굴할 수 있었다.

또한 상기 3종의 병원체를 각기 정량적으로 검출해 낼 수 있는, 핵산 기반 신속 진단법들을 개발하여 질병의 현장에서, 그리고 국가적 질병제어를 위한 검사기관에서 사용할 수 있도록 하였을 뿐 아니라, 양봉 현장에서 양봉인이 직접 시험할 수 있는 면역클로마토마토그래피법을 기반으로 한 래피드키트를 개발하여, 양자 모두 시제품을 넘어 제품화의 단계에 도달하게 하였다.

이울러 꿀벌의 유충을 이용하는 대용량 약물후보 검색 시스템을 확립할 수 있었으며, 바이러스 연구에 필수적인 꿀벌유래 세포주의 개발에서도, 우수한 초대 배양의 조건을 확립하는 등 소기의 목적을 달성할 수 있었다.

또한 양봉농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼도 개발하였다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

주요 3개 질병의 병원체에 대한 실험실용 정밀 정량 검사법들(초고속 PCR법)과 양봉 현장용 간이진단법들(면역크로마토그래피법)의 제품화는, 양봉질병에 관한 국가의 질병제어 정책을 변환시킬 수 있는 기반을 만든 것이라 하겠다. 지난 수십년간 약제의 무상분배로 인하여 질병에 대한 저항성만 높아지게 된 것은 지금은 지양해야할 정책이며, 이제 양봉현장에 간이진단키트를 적극적으로 배포하고, 그 결과에 따라 양봉인이 국가기관의 지도하에 치료를 수행하는 “선진단 후치료”의 정책을 시작하여야 할 것이다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of total control techniques against major infectious diseases in honey bee

II. Research objectives and performance

The aim of this research is a development of integrated control system against Sacbrood, foulbrood and Stonebrood diseases which are the major infectious disease of honeybee. At first, it was able to present a method of blocking transmission of viral disease and also can present valid therapeutic agents more than 9 species about major three honeybee species and developed on-site immunochromatography methods. 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 etiologic agents 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.

Quantitative results compared to objects are shown in the table below.

III. Purpose and need for research

The aim of this research is a development of integrated control system against Sacbrood, Foulbrood and Stonebrood diseases which are the major infectious disease of honeybee. To achieve this goal, we observed and developed effective honeybee drugs for treatment and prevention of diseases. Also we found out the standard methods for using these drugs and effective immune substances.

This study was triggered by the emergency of domestic honeybee annihilation. Actually, there are weak governmental efforts about diseases of honeybee and also, have not been established the basis of researches such as honeybee primary cell lines which could be

used for studying viral diseases. Through this research, we tried to increase the weak research bases on the parts of entomology, biology and veterinary medicine

IV. Research contents and scope

In this research, we focused on the three kinds of infectious diseases ,sacbrood, foulbrood and stonebrood, and that are derived from SBV, *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*

For establishing the integrated control technologies for major infectious diseases of honeybees, we tried 1) Study on the major route of infection, 2) Identification of effective therapeutics, and 3) detection method for quantitative detection of etiologic agents, and 4) development of the search system to retrieve a large drug candidate, and 5) subsequent viral disease study the construction of such cell lines derived from bees had become a great tool research and development.

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.

V. Research and development results

Firstly, we were able to present a control method of pests such as bees mite and found out the valid curable drugs more than three kinds against three kinds of honeybee diseases

Secondly, we developed the nucleic acid based diagnostic rapid detection methods and immunochromatography based rapid kits for being able to use and detect the three kinds of diseases on field.

In addition, it was able to establish a large drug candidate search system using the bee larvae and also was able to achieve the intended purpose that is establishment of a great primary cell culture conditions for viral researches.

Finally, it has developed a standard manual to control the major diseases that can be utilized immediately in beekeeping farms.

VI. Research and performance utilization plan

The laboratory precision quantitative tests about major three pathogens and the

commercialization of simple diagnostic methods(immunochromatography) make a base to change the disease control policy about honeybee diseases.

Now we have to actively deploy the simplified diagnostic kits in beekeeping field and start to the policy “Treatment after diagnosis” that can treat diseases under the guidance of national authorities.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Abstract	2
English Summary	4
Chapter 1. Introduction and summary of the research	21
Chapter2. The present technical state	23
Chapter3. Research contents and Results	26
1. Bee virus propagation mechanisms by bees mite	26
A. Methods of bee virus transmission mechanism	26
B. Results of bee virus transmission mechanism	28
2. Viral suppression through the bee mite management	31
A. Methods about viral suppression through the bee mite management	34
B. Results of viral suppression through the bee mite management	38
3. Development of bee larvae and bee mite indoor breeding techniques	53
A. Method about development of bee larvae and bee mite indoor breeding techniques	53
B. Results of development of bee larvae and bee mite indoor breeding techniques	56
4. Development of environmentally friendly medicament for the prevention	

of bee mites	58
A. Development of environmentally friendly medicament for the prevention of bee mites: materials and methods	59
B. Development of environmentally friendly medicament for the prevention of bee mites: results and discussion	60
5. Development of environmentally friendly medicament for the prevention of bee pests	67
A. Prevention test of <i>Galleria mellonella</i> L.	67
(1) materials and methods	67
(2). Results and discussion	70
6. Development of high-speed quantitative assays for kSBV	81
A. Introduction	81
B. Material and methods	82
C. Results and discussion	85
7. Development of on-site high-speed detection method using special PCR for Stonebrood and Chalkbrood disease	93
A. Introduction and summary	93
B. Material and methods	94
C. Results and discussion	96
8. Development of new anti-pathogen substance with actinomycetes	100
A. New cultivation techniques for separating the non culturable actinomycetes	100
B. Isolation of strains producing antibiotics	101
C. Construction of Actinomycetes library	104
D. Test strains	104
E. Analysis of antimicrobial substances	105
F. Taxonomic characterization of separated new strain	106
G. Ensuring strains of antibiotic against American foulbrood	112
H. Cluster analysis and new strain feasibility analysis about isolated stains	122
I. Antibiotic / antifungal research of general pathogen using AFB strain	124
J. Medium selection of high efficiency actinomycetes creating optimal antibiotic	132

K. Extraction and antimicrobial investigations of biologically active substances in Actinomycetes culture medium	133
L. Spores collection and CFU measurement for infection of AFB	137
M. Isolation of Actinomycetes for Chalkbrood and Stonebrood control	138
N. Substance analysis using the Streptomyces sp. T258 supernatant extract	143
O. Substance analysis using the Kitasatospora sp. T1304 supernatant extract	144
P. Substance analysis using the Bacillus sp. T515 supernatant extract	147
Q. Substance analysis using the Strain UCM-25와 UCM-70 supernatant extract	148
R. Taxonomic features of a new Actinomycetes, Streptomyces fabae T66	150
9. Antibacterial and antifungal efficacy excavation of Scoria and isolated actinomycetes	158
A. Antibacterial evaluation about Scoria	158
B. Stonebrood inhibitory effect of environment isolated Streptomyces X	160
10. Development of gene therapy for the prevention and treatment Sacbrood	163
A. Overview and objectives of the research project	163
B. Results of research	163
11. Development of specific antibiotic / antimicrobial substance against Paenibacillus larvae and Ascosphaera apis	191
A. objectives of the research project	191
B. Antimicrobial substances' activity against Paenibacillus larvae	193
C. Bee antifungal selection for Ascosphaera apis, the cause of stonebrood disease	194
D. Laboratory evaluation of the efficacy about the activity of selected antimicrobial material	197
12. Analysis of viral replication and aspect on honeybee artificial infection of kSBV	198
A. introduction	198
B. Summary of Results	198
13. Efficacy analysis of bee diseases prevention and treatment of substance	

using histopathological examination and organization hybridization method	206
A. Development of organization hybridization method about sacbrood disease	206
B. Establishment of natural infection model about sacbrood disease	208
C. Development of organization hybridization method about foulbrood	210
D. Development of specific process of dyeing about stonebrood	211
E. Development of organization hybridization method about sacbrood	212
F. Sacbrood virus distribution and observation of the tissue in natural infected tissue	218
G. Development and application of organization hybridization method about foulbrood	221
H. PAS and H & E staining results about Stonebrood disease	222
14. Mass production of four kinds of specific proteins of honeybee pathogenic viruses	224
A. Introduction	224
B. materials and methods	225
C. Results and discussion	229
15. Sacbrood virus detection using a specific monoclonal antibody	241
A. Introduction	241
B. Summary of results	241
16. Detection of Sacbrood virus using a specific monoclonal antibody in Jeju Univ.	245
A. Development of AFB preventive therapeutic efficacy validated method by immunoassay	245
B. EFB preventive therapeutic efficacy validated method by immunoassay	251
C. kSBV preventive therapeutic efficacy validated method by immunoassay	255
17. Development of virus culture methods through the bee-derived cell culture	259
A. Primary culture of bee-derived cell	262
B. Production of the vector to induce immortalization of honeybee cells	272
C. C-Myc transgenics of primary cultured working bee's cell	275
D. Cell culture of queen bee larvae	281

E. Immortalization of bee cells using a retroviral vector	285
18. Honeybee derived new cell culture methods	298
A. Overview of experimental methods	298
B. honeybee eggs collection and incubation	300
C. Analysis of kSBV Infection in the honeybee derived culture cells	316
19. Pathogen infection and drug resistance test method using bee larvae	332
A. Development of Quantitative pathogen infection method for the bee larvae	332
B. Toxicity testing of drug candidates using bee larvae	339
20. Standard control methods for honeybee major diseases	343
A. Standard control methods about kSBV	343
B. Detection and treatment of AFB and EFB	353
C. Treatment of pathogenic fungi such as Chalk brood and Stone brood disease	356
Chapter 4. Object achievement and related fields of their application	359
Chapter 5. Products of the research and their application—plan	377
Chapter 6. Scientific and technical Information of foreign countries	382
Chapter 7. Research equipments and facilities	383
Chapter 8. Implementation Performance of Laboratory Safety Management	384
Chapter 9. Reference	392

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 및 성과목표	21
제 1절	연구개발의 목적, 필요성 및 범위	21
제 2절	연구성과 목표 대비 실적	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황	23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1절	꿀벌응애에 의한 꿀벌바이러스 전파 기작	26
1.	꿀벌 바이러스 전파 기작의 연구방법들	26
가.	꿀벌바이러스 검색용 RT-PCR	26
나.	꿀벌응애에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌 바이러스의 검출	27
다.	꿀벌에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌 바이러스의 검출	28
2.	꿀벌바이러스 전파 기작의 연구결과	28
가.	꿀벌응애에서 RT-PCR법을 이용한 꿀벌바이러스 검출	28
나.	꿀벌성충에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌바이러스 검출	28
다.	수벌에서의 RT-PCR을 이용한 꿀벌바이러스 검출	29
제 2절	꿀벌응애 관리를 통한 바이러스 억제	31
1.	꿀벌응애 관리를 통한 바이러스 억제 연구방법	34
가.	꿀벌응애 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가	34
나.	꿀벌응애류 방제 방법에 대한 효율 평가	34
다.	꿀벌응애류의 개체군에 대한 연중 발생 모니터링	34
2.	꿀벌응애 관리를 통한 바이러스 억제 연구결과	38
가.	꿀벌응애 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가	38
나.	꿀벌응애류 방제 방법에 대한 효율 평가	40

다. 꿀벌응애류의 개체군에 대한 연중 발생 모니터링	41
라. 꿀벌응애의 종합적 방제 체계 확립	50
제 3절 꿀벌 유충 및 꿀벌응애 실내 사육 기법 개발	53
1. 꿀벌 유충 및 꿀벌응애 실내 사육 기법 개발의 연구방법	53
가. 꿀벌 유충 실내 사육 기법	53
나. 꿀벌응애 사육 시스템 개발	55
2. 꿀벌 유충 및 꿀벌응애 실내 사육 기법 개발의 연구결과	56
가. 꿀벌 유충 인공 먹이량에 따른 우화율 평가	56
제 4절 꿀벌응애의 방제를 위한 친환경 약제의 개발	58
1. 꿀벌응애 방제용 친환경 약제의 개발: 재료 및 방법	59
가. 꿀벌 시료	59
나. 꿀벌응애류 방제 친환경 약제	60
2. 꿀벌응애 방제용 친환경 약제의 개발: 결과 및 고찰	60
가. 꿀벌응애류 방제용 친환경 약제 살충력 시험	60
나. 꿀벌응애와 중국가시응애의 봉군 내 상호작용	62
제 5절 꿀벌해충의 방제를 위한 친환경 약제의 개발	67
1. 꿀벌부채명나방 방제 시험	67
가. 재료 및 방법	67
(1) 꿀벌부채명나방(<i>Galleria mellonella</i> L.) 사육	67
(2) <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주 분리	68
(3) <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주 살충력 검정	68
(4) <i>Bacillus thuringiensis</i> 균주의 Plasmid DNA분리	69
(5) 내독소 단백질 유전자형 조사를 위한 PCR	69
(6) 배지선발 및 대량배양	69
나. 결과 및 고찰	70
(1) 토종벌 기생 및 출입 해충 조사	71
(2) 꿀벌부채명나방 방제 균주 선발	72
(3) 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 제제(B.t) 대량 배양 기술 개발	75
(4) 대량 배양된 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 제제(B.t) 살충력 검정	78
제 6절 낭충봉아부패병의 원인체 kSBV에 대한 초고속 정량 검사법의 개발	81
1. 서론	81

2. 재료 및 방법	82
가. Sample(Honeybee larvae)	82
나. Total RNA isolation	82
다. cDNA 합성 (Reverse Transcription)	82
라. Plasmid construction	82
마. Primer 제작	82
바. RT-PCR을 사용한 Primer 선별	83
사. Temperature gradient RT-PCR	83
아. RT-PCR을 사용한 sensitivity Test	84
자. 꿀벌 Genomic DNA의 오염 하에 specific RT-PCR의 sensitivity Test	84
차. Ultra-Rapid Real-Time PCR을 사용한 Denaturation, Annealing/ Extension 온도의 최적화	84
카. URRT-PCR을 사용한 Primer 민감도 test	84
타. URRT-PCR의 각 step 시간 최소화	84
3. 결과 및 고찰	85
가. Real-Time PCR을 사용한 Primer 선별	85
나. RT-PCR을 사용한 KSBV-vp2 primer의 최적 Annealing temperature	86
다. RT-PCR을 사용한 Primer sensitivity test	86
라. RT-PCR 각 step의 시간 축소	86
마. cDNA synthesis 시간 축소	87
바. KSBV-URRT detection limit 민감도 test	88
사. Detection 할 수 있는 2-step URRT-PCR 최소화 시간	89
아. 가장 빠른 detection 방법을 이용한 kSBV 진단	90
제 7절 석고병과 백목병의 특이 PCR을 이용한 신속 현장 진단법의 개발	93
1. 서론 및 요약	93
2. 재료 및 방법	94
가. 시료 수집과 DNA 순수 분리	94
나. 프라이머의 설계	95
다. 초기 주형량에 따른 검출 한계 확인	95
라. 외부 DNA 오염에 따른 검출 한계 확인	95
마. 꿀벌 시료의 DNA에 의한 오증폭 가능성 확인	96
바. 최소 검출 시간 확인	96
3. 결과 및 고찰	96
가. 프라이머 선택	96

나. 초기 주형량에 따른 검출 한계	97
다. 외부 DNA 오염에 따른 검출 한계	98
라. 실제 별 시료의 DNA의 검출 가능성	99
마. <i>Aspergillus flavus</i> 와 <i>Ascospaera apis</i> 의 검출을 위한 최소 검색 시간	99
제 8절 방선균을 이용한 신 항병원체 물질의 개발	100
1. 난배양성 방선균을 분리하기 위한 신배양기술	100
가. 액상 배양시스템	100
나. 고체상 배양시스템	101
2. 항생물질을 생산하는 균주의 분리	101
가. 배지 및 배양	101
나. Sampling sites	104
3. 방선균 library 구축	104
4. 테스트 균주	104
5. 항균물질의 분석	105
6. 분리된 신종균주의 분류학적 특성 분석	106
가. 균주의 동정	106
나. 분리 신종균주의 최적 배양조건 도출	107
다. 생리·생화학적 특징(Physiological characteristic)	109
7. 미국부저병균에 대항한 항생균주의 확보	112
8. 분리균주의 균집분석 및 신종 가능성 분석	122
9. 미국부저병 균주를 이용한 일반 병원성균들의 항생/항진균성 조사	124
10. 고효율 방선균의 최적 항물물질 생성 배지 선발	132
11. 방선균 배양액에서 생리활성물질의 추출 및 항균성 조사	133
12. 미국부저병균 감염을 위한 포자수집 및 cfu 측정	137
13. 백목병과 식고병 제어를 위한 방선균 분리	138
14. <i>Streptomyces</i> sp. T258의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석	143
15. <i>Kitasatospora</i> sp. T1304의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석	144
16. <i>Bacillus</i> sp. T515의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석	147
17. Strain UCM-25와 UCM-70의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석	149
18. 신종 방선균인 <i>Streptomyces fabae</i> T66의 분류학적 특징	150
제 9절 화산석(Scoria) 및 분리 방선균의 항균 및 항진균 효능의 발굴	158
1. 스코리아(송이석)의 항균성 평가	158
가. 스코리아 시료.	158

나. 송이석 함유 배지에서 미국부저병균 <i>Paenibacillus larvae</i> 의 배양	158
다. 송이석 함유 배지에서 백목병균 <i>Ascospaera apis</i> 의 배양	159
2. 환경분리 Streptomyces X의 석고병 억제 효능	160
가. 곰팡이 발육억제 효과	162
나. 세포독성	162
다. 잠정적 결론	162
제 10절 낭충봉아부패병의 예방 및 치료를 위한 유전자 치료방법 개발	163
1. 연구과제의 개요 및 목표	163
2. 연구의 결과	163
가. 애벌레 인공 감염을 위한 낭충봉아부패병 바이러스의 분리	163
나. 유전자 치료를 위한 후보 유전자 선발	165
다. PCR 증폭산물을 전기영동한 gel 내 DNA 추출	168
라. dsSBV, dsVP1 유전자 클로닝	169
마. dsRNA (dsSBV) 유전자 시퀀싱 분석	171
바. T7 RNA polymerase를 이용한 대량의 single strand RNA 합성	175
사. 후보물질 선발을 위한 스크리닝 시스템의 개발	175
아. 후보 siRNA의 SBV 발현 억제 능력 확인	176
자. SBV 정량분석을 위한 real-time PCR system	180
제 11절 <i>Paenibacillus larvae</i> 와 <i>Ascospaera apis</i> 에 특이 항생/항균제 개발	191
1. 연구의 목표	191
가. 벌집으로부터 부저병균 분리 및 동정	191
2. 항균물질의 <i>Paenibacillus larvae</i> 에 대한 항균활성	193
3. 꿀벌 석고병 원인 곰팡이(<i>Ascospaera apis</i>)에 대한 항진균제 선발	194
4. 선발된 항균 활성 물질의 실험실적 효능 평가	197
제 12 절 kSBV의 서양종 꿀벌 인공 감염에서 바이러스의 복제 능력 및 양성 분석	198
1. 서론	198
2. 요약 결과	198
제 13 절 조직내 교잡법과 병리조직학적 검사를 통한 꿀벌 질병의 예방 및 치료 물질 의 효능 분석	206
1. 낭충봉아 부패병에 대한 조직 내 교잡법 개발	206
가. 낭충봉아 부패병 바이러스 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작	206

나. 낭충봉아 부패병 바이러스 특이 탐색자(probe) 제작	206
다. 애벌레 및 꿀벌 성충 조직을 탐색을 위한 파라핀 고정 방법 개발	206
라. 정상 애벌레 조직 및 꿀벌 성충 H&E 염색법 개발, 판독	207
마. 조직내 교잡법을 이용한 애벌레에서 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산 검출	207
바. 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산의 애벌레 조직내 교잡법 결과 분석 방법	207
2. 낭충봉아 부패병의 자연 감염 모델 확립	208
가. 낭충봉아 부패병 바이러스 자연감염 농장 확보 및 진단 샘플 확보	208
나. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 진단 샘플 확보	208
다. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 조직 내 병변 확인	209
라. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 시기별 조직 내 바이러스 분포	210
3. 부저병에 대한 조직 내 교잡법 개발	210
가. 부저병 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작	210
나. 부저병 세균 특이 탐색자(probe) 제작	210
다. 조직내 교잡법을 이용한 애벌레에서 부저병 세균 핵산 검출	210
4. 석고병에 대한 특이적인 염색법 개발	211
가. 석고병 감염 개체에 대한 H&E 염색 및 판독	211
나. PAS 염색을 통한 석고병 감염 개체의 균사체 염색 및 H&E 염색과 비교	211
5. 낭충봉아 부패병에 대한 조직 내 교잡법 개발	212
가. 낭충봉아 부패병 바이러스 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작	212
나. 애벌레 성충 조직 제작 기법 확립 및 낭충봉아 부패병 바이러스 특이 탐색자(probe) 제작	212
다. 정상 애벌레 조직 및 꿀벌 성충 H&E 염색법 개발, 판독	213
라. 조직내 교잡법을 이용한 애벌레에서 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산 검출	214
6. 자연감염 조직에서의 낭충봉아 부패병 바이러스의 분포와 조직 판독	218
가. 3일령 이하 애벌레 조직 내 항원 분포	219
나. 3~7일령 애벌레 조직 내 항원 분포	219
다. 7일령 이상 애벌레 조직 내 항원 분포	220
7. 부저병에 대한 조직 내 교잡법 개발 및 적용	221
가. 부저병에 특이적인 진단 프라이머 제작	221
나. 조직 내 교잡법을 이용한 애벌레에서 부저병 감염 확인	221
8. 석고병에 대한 PAS 및 H&E 염색 결과	222
가. 석고병에 감염된 개체의 H&E 염색결과	222
나. 석고병 균사체의 PAS 와 H&E 염색 사진 비교	223
제 14 절 꿀벌 병원성 바이러스 4종 특이 단백질들의 대량 생산	224
1. 서론	224

2. 재료 및 방법	225
가. 시료의 확보 및 RNA의 순수분리	225
나. Reverse Transcription	225
다. Molecular cloning of each protein gene from DWV	225
라. 재조합 DWV 단백질들의 발현	227
마. DWV 재조합 단백질의 정제	228
3. 결과 및 고찰	229
가. DWV 유전자들에서 유래된 재조합 단백질의 염기서열 분석	229
나. DWV 재조합 단백질들의 발현 확인	237
다. DWV 단백질의 정제	238
제 15 절 특이 단일클론항체를 이용한 Sacbrood Virus의 검출	241
1. 서론	241
2. 요약 결과	241
가. 재조합 SBV-Capsid protein의 발현 및 정제	241
나. SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 선발	242
다. SBV-Capsid 단일클론항체들의 항원 특이도	242
라. Native 항원에 대한 SBV-Capsid 단일클론항체의 항원 특이도	243
마. 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체의 교차반응성	243
바. 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체들의 민감도	244
사. 감염시료에 대한 SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 적용	244
제 16 절 제주대 특이 단일클론항체를 이용한 Sacbrood Virus의 검출	245
1. 면역분석법에 의한 AFB 예방치료제 효능검증법 개발	245
가. P. larvae에 대한 단클론항체 제작	245
나. ELISA system	248
다. ELISA의 검출감도	249
라. ICG system	249
마. 시제품의 민감도 조사	250
2. 면역분석법에 의한 EFB 예방치료제 효능검증법	251
가. <i>Melissococcus plutonius</i> 에 대한 단클론항체 제작	252
나. ELISA system	254
3. 면역분석법에 의한 kSBV 예방치료제 효능검증법	255
가. 감염충체로 부터의 면역원의 준비	255
나. kSBV 감염 현장적용 ICG 시제품	256

제 17절. 꿀벌유래 세포배양을 통한 바이러스 배양법 개발	259
1. 꿀벌유래세포의 초대배양	262
가. 애벌레의 채집	262
나. 배지의 조성	263
다. 초대배양	263
라. 초대배양 세포의 크로닝	264
마. 로얄제리 배지를 이용한 세포의 배양	267
2. 벌꿀세포의 불멸화를 유도할 벡터의 제작	272
3. 초대배양 일벌세포의 c-Myc 유전자 도입	275
가. 초대배양 방법	275
나. 초대배양 세포의 유전자 도입	277
다. 애벌레 체액과 sf-21 세포배양액을 첨가한 배지의 제작	278
라. 유전자 도입 결과	278
4. 여왕벌 애벌레의 세포배양	281
가. 여왕벌 애벌레의 채집	281
나. 여왕벌 애벌레의 세포의 배양	281
다. 초대배양 세포의 크로닝	283
5. 레트로바이러스 벡터를 이용한 꿀벌세포의 불멸화	285
가. 레트로바이러스의 감염 과정	286
나. 레트로 바이러스 벡터 제작과정	288
다. 재조합 레트로 바이러스 입자의 제작	290
라. 유전자 도입과 세포의 크로닝	292
마. 세포의 암세포화 확인 실험	292
바. 세포의 암세포화 확인 결과	293
제 18 절 꿀벌 유래 신 세포배양 기법	298
1. 실험방법의 개관	298
가. 꿀벌 알 수집	298
나. 멸균액 및 멸균과정	298
다. 꿀벌세포의 일차세포배양을 위한 적절한 배양액 선별	298
라. aggregation culture	298
마. 세포증식 측정	299
바. PCR 기법을 이용한 꿀벌 유래 세포의 확인	299
사. Real time PCR	299
2. 꿀벌 알 수집 및 배양	300
3. 꿀벌 유래 배양세포에서 kSBV 감염의 분석	316

제 19 절	꿀벌 유충을 이용한 병원체 감염법 및 약제 저항성 검사	332
1.	꿀벌 유충에 대한 정량적 병원체 감염법 개발	332
2.	꿀벌 유충을 이용한 약제 후보 물질의 일반 독성 검사	339
제 20 절	꿀벌 주요 질병에 대한 표준 제어법	343
1.	낭충봉아부패병(kSBV)에 대한 표준 제어법	343
2.	미국부저병(afb), 유럽부저병(efb)에 대한 진단 및 처치	353
3.	백묵병(cb), 석고병(sb) 등 병원성 진균에 대한 처치	356
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	359
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	377
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	382
제 7 장	연구시설·장비 현황	383
제 8 장	연구실 안전관리 이행실적	384
제 9 장	참고문헌	392

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절. 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

본 연구의 목적은 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다. 이 목표를 달성하기 위하여, 상기 꿀벌 질병의 치료 및 방제를 위한 효과적인 꿀벌약품들을 탐색 및 개발하고, 꿀벌에 무분별하게 사용되어온 약품 등(미등록 약품 포함)에 대한 표준사용법을 개발하고, 유효한 면역증강 물질을 탐색 및 개발하고자 하였다.

본 연구는 2011년 이래 낭충봉아부패병(korean Sacbrood virus)에 의한 국내 토종벌의 전멸위기에 기인하여 촉발된 바가 크며, 종전 꿀벌질병제어에 대한 정부의 정책이, 다만 양봉인에게 치료약제를 무상 지급하여 온 것에 대하여 개선의 방향을 찾고자 하는 의미도 있을 것이다. 꿀벌의 질병은 사실 정부의 통합적 제어 노력이 미약하였고, 바이러스 질병연구의 주된 도구인 꿀벌 유래 세포주도 확립되지 않은 등 연구의 기반도 매우 미약한 수준에 머물러 있었다.

본 과제는 곤충학, 생물학, 수의학의 제 분야에서 연구자들이 합심하여 꿀벌질병에 대한 미약한 연구기반을 보다 높이는데 의의가 있다고 하겠다.

본 연구는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병, 부저병, 및 석고병을 대상으로 하며, 해당 병원체는 각각 바이러스인 SBV, 세균인 *Paenibacillus larvae*, 진균인 *Ascosphaera apis* 이다.

이들 3종의 병원체 그리고 질병에 대한 통합 방제시스템을 구축하기 위하여, 1) 주요 감염 경로에 대한 연구, 2) 유효한 치료제의 발굴, 3) 각 병원체를 정량적으로 검출할 수 있는 검출방법, 4) 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 검색시스템 개발, 그리고 5) 차후 바이러스 질병 연구에 큰 도구가 될 꿀벌유래 세포주의 구축 등을 연구 개발하였으며, 농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 메뉴얼도 개발하고자 하였다.

제 2 절. 연구성과 목표 대비 실적

본 연구의 목표는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다.

이에 대하여, 먼저 바이러스 질병의 전파 차단방법을 제시할 수 있었으며, 3종의 주요 꿀벌에 대하여 9종이상의 유효한 치료제를 제시할 수 있었고, 3종의 병원체를 각기 정량적으로 검출해 낼 수 있는, 핵산 기반 신속 진단법들, 현장용 면역클로마토마토그래피법을 개발할 수 있었다. 아울러 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 시스템과 꿀벌유래 세포주의 개발에서도 우수한 초대 배양의 조건을 확립하는 등 초기의 목적을 달성할 수 있었다.

정량적인 목표 대비 실적은 아래표와 같다.

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술 이전	사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용·홍보		기타 (유전자 원등록, 타 연구 활용 등)
	출 원	등 록		제 품 화	기 술 창 업	매 출 창 출	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	9	6	6	4	0	0	0	0	0	13	11	0	8	0	2	8	11
연구기간 내 달성실적	15	2	6	4	0	0	0	0	0	17	28	79	8	23	2	8	18
달성율 (%)	167	33	100	100	-	-	-	-	-	131	255	100	100	100	100	100	164

* 각 성과의 내역들은 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도에 수록함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

꿀벌응애류의 방제를 위한 약제의 사용은 거의 대부분의 나라에서 사용하고 있는 것이 유기산으로는 옥살산, 개미산이 대표적이고 플루바리네이트, 플루메쓰린 계열의 약제는 아시아권 국가에서 많이 사용을 한다. 그러나 기존의 약제들은 애애류에 대한 내성의 증가 등과 같은 부작용을 가지고 있어 응애류의 효과적인 방제가 이루어지지 못하였다.

최근 개발된 신규 기술의 경우에는, 영국에서 꿀벌응애는 1992년에 처음 발견되어 벌통의 75% 이상을 잃게 되었다. 피레스로이드로 알려진 화학제가 꿀벌응애를 방제하는데 효과적인 것으로 판명되었지만 약제의 오남용으로 인해 이들 화학제들에 대한 응애 저항성을 야기하였다.

그러나 영국 사우스햄튼에 본사를 둔 Exosect가 벌통 주변으로 다른 꿀벌응애 방제제를 효율적으로 옮겨줄 수 있는 신규 방법을 개발하였다. 이 Exomite system의 핵심은 그 파우더가 갖는 고유한 전기력을 이용하여 꿀벌에게 화합물들을 부착시킬 수 있다는 점이다. 담체로써 이용되는 그 왁스 파우더는 인체에 무해한 식품 수준의 안전한 물질이다. 그 전하를 띤 파우더는 다른 살비제들에서 사용되고 있는 티몰(thymol)과 같은 오일과도 함께 적용할 수 있다.

꿀벌에 파우더를 묻히기 위해 Exosect는 벌통 입구에 들어맞는 트랩을 고안했다. 벌들이 그 트랩을 통과할 때 파우더의 일부를 벌들이 몸에 묻혀 벌통 여기저기에 분산시키게 된다. Meridian 양봉협회(Meridian Beekeepers Association) 소속 회원들의 벌통에서 수행된 Exomite의 시험결과를 통해 응애의 숫자가 아주 많아도 이들 응애에 대해 우수한 녹다운 효과가 입증되었다. Exomite 파우더는 또한 다른 꿀벌응애 방제제들보다 응애를 녹다운하는데 있어서 훨씬 더 소량의 티몰을 사용해도 가능하다.

따라서 Exosect 관계자들은 이 파우더를 통해 피레스로이드계 살비제들이 아닌 양봉인들이 진정 원하는 다른 살비제들을 이용할 수 있을 것으로 기대한다. 영국양봉협회에서는 꿀벌응애의 저항성 발달 위험성을 감소시키기 위해 다양한 살비제들을 순환적으로 이용할 것을 권고하고 있다. 국내의 꿀벌응애류 방제를 위한 약제의 개발은 화학농약을 이용한 약제 제조가 단 한차례 시도 되었으나 약제의 부작용으로 인하여 사용이 확대 되지 못하였는데, 본 연구에서는 이러한 화학 농약 성분의 약제의 첨가가 없이 천연물질을 이용한 혼연제 및 혼중제를 개발하여 그 기술적 수준이 매우 높고 친환경적이라는데 기술적 장점이 있다.

또한 벌집에 기생하면서 벌꿀 생산성을 저하시키며, 특히 토종벌에 기생하면서 낭충봉아부패병을 전염시키거나 봉군을 폐사시키는 해충인 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.)의 방제를 위하여 친환경 미생물 제제에 대한 연구로써 *Bacillus thuringiensis* sp. 대한 연구가 발표된 바가 있다. *Bacillus thuringiensis* (Bt)는 생물학적 살충제로 전 세계적으로 알려져 있는 미생물로써 곤충의 섭식 행동에 따라서 곤충의 장에서 활성을 가지면서 내독소 단백질이 곤충

의 유충을 죽이는 기작으로 작용을 하는데, 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.)에 대한 살충력을 가지고 있는 Bt제에 대한 연구결과가 Burges 와 Bailey(1968), Burges(1970)에 의하여 발표된 적이 있다.

꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 주로 밀랍을 먹고 자라는 곤충으로써 전 세계적으로 6종이 분류되어 있으며(Amett, 1985), 국내에는 *Galleria mellonella* L.와 *Achroia grisella* 2종이 양봉농가에 피해를 주는 것으로 알려져 있다(Calvert, 1982; Hachiro and Knox, 2000; 우 등, 1995). 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 의한 서양종꿀벌(*A. mellifera* L.) 피해로는 저장된 빈 벌집 및 먹이용 벌집을 사용하지 못할 정도의 피해를 유발한다(Caron, 1992). 또한, 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 벌통과 벌통사이를 이동하기 때문에 부저병과 같은 질병을 매개하여 피해를 가중하기도 한다(Charrirer and Imdorf, 1999).

이러한 꿀벌에 피해를 유발하는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)의 방제를 위하여 많은 노력이 있어왔으며, 대표적인 방법으로 온도조절을 통한 고온 및 저온처리, 이산화탄소를 처리하는 방법이 많이 알려져 있으며, 화학적인 방법으로는 훈연제인 P-dichlorobenzene (PDB), 아세트산, 시안화칼슘, 다이브롬화 에틸렌, 메틸 브로마이드, 포스핀 등으로 방제하기도 한다(Hood et al., 2003).

그러나 화학물질에 의한 방제는 벌꿀에의 잔류 등으로 인한 인체 유해물질의 잔류 위험성이 있어서 인체에 무해한 친환경 방제 기술의 개발을 위한 연구 결과로 Bt제의 개발에 대한 보고도 있다. 특히, *B. thuringiensis aizawai*의 경우 나비목 곤충에 살충력을 보이면서(Tabashnik et al., 1994; Liu et al., 1998) 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에도 효과적인 살충 효과를 가지고 있음이 보고된 바 있다(Li et al., 1987).

그 외의 연구 결과로써 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 의한 피해를 예방하기 위하여 Bt 내독소단백질 발현유전자를 옥수수에 형질전환 시켜 꿀벌의 먹이원인 화분에 Bt 내독소 단백질이 발현되게 하여 살충력을 가지고 있는 형질전환 옥수수 화분을 먹여서 방제하는 방법도 발표되었다(Anne et al., 2003).

따라서 본 연구에서는 국내에서 분리된 *B. thuringiensis* K1과 K2의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 대한 살충력을 검정하고 이의 이용을 통한 양봉농가의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 피해를 예방하기 위하여 연구를 수행하였다.

1. 국내 기술개발 현황

국내 주요 병해충 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과 꿀벌육종연구실, 농림축산검역본부 세균질병과, 경기대학교 생물학과, 안동대학교 식물의학과에서 주도적으로 연구되고 있다. 경기대학교에서는 질병을 주요 연구과제로 하고 있으며, 많은 연구들이 이루어지고 있다. 대부분 질병진단법들이 연구되고 있다. 안동대학교에서는 꿀벌응애류, 말벌

류, 화분매개서비스가 연구되고 있다. 국외에서 진행되고 있는 연구를 바탕으로 후행 연구가 주를 이루고 있다. 또한 각 분야에 대한 단독적인 연구만 진행되고 있으며, 질병과 해충의 상호작용에 대한 공동연구는 이루어지지 않고 있는 실정이다.

2. 국외 연구 현황

국외 주요 병해충 연구는 대부분 새로운 질병과 해충을 검출하는 것이다. 질병은 분자생물학적 기술이 발달하여 육안으로 구별이 불가능한 질병을 검출하고 방제법이 연구되어진다. 또한 해충에서는 외부 또는 내부기생성 해충에 대한 연구가 주를 이룬다. 이들에 대한 분류학적 연구나 이들에 의한 상호작용 등에서도 분자생물학적 기술을 이용한 연구들이 많이 진행되고 있다. 최근에는 바이러스에 대한 매개자로 응애류를 지목하였으며, 응애류가 바이러스와 꿀벌에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 진행되고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 꿀벌응애에 의한 꿀벌바이러스 전파 기작

꿀벌에 바이러스성 질병이 감염되면 뚜렷한 증상이 나타내지 않는다. 꿀벌에 나타나는 증상은 성장부진으로 인해 몸체의 크기가 작아지거나, 성충 발육 직전 사망하게 된다. 또한 마비 증상으로 인해 비행을 못하거나, 비정상적인 행동 양상을 보인다. 분자 생물학적 진단법의 발달을 통해 바이러스성 질병을 쉽게 정확하게 구별할 수 있게 되었다. 본 연구는 꿀벌 성충과 꿀벌응애류에 발생하는 바이러스를 검출하여 전파 기작을 파악하는 것이다.

1. 꿀벌바이러스 전파 기작의 연구방법들

가. 꿀벌바이러스 검색용 RT-PCR

(1) 시료 채취

RT-PCR에 사용된 시료는 양봉현장에서 채집하여 살아있는 상태를 유지한 후 즉시 Total RNA의 분리에 사용하였으며, 실험에 사용된 시료들은 액체질소 처리 후에 -70°C 에 보관하였다(최 등, 2008).

(2) Total RNA의 분리와 First-Strand cDNA 합성

Total RNA는 시료를 액체질소로 동결시킨 상태에서 분쇄한 후 SV RNA extraction Kit (Promega)의 방법에 따라 분리하였으며, 최종적으로 $50\mu\text{L}$ RNase-free water에 elution 하였다. Total RNA 농도는 $260\text{nm}/280\text{nm}$ 흡광도값의 비율로 결정하였다. 분리한 RNA는 oligo-dT primer와 cDNA Synthesis Kit (Promega)에 의한 역전사 효소반응 PCR (RT-PCR)을 통해 First-Strand cDNA를 합성하였다(최 등, 2008).

(3) RT-PCR analysis

First-Strand cDNA는 gene-specific primer와 control primer를 이용한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 바이러스의 검출에 사용된 specific Primer는 GenBank에 등록된 nucleotide sequences와 바이러스 유전자 특이 primer를 자체 제작하여 바이러스를 진단하는데 사용하였다(표 2-1). PCR 증폭반응은 PTC-200 (MJResearch, USA)을 사용하였으며, Pre-denaturation 95°C 5분, 94°C 30초 48°C 30초 72°C 45초로 35cycle을 반복하고 72°C 에서 5분간 final extension을 수행하였다. PCR 산물은 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide가 함유된 1% agarose gel 로 전기영동 하여, UV-light를 통해 확인하였다(최 등, 2008).

표 1-1. 꿀벌 바이러스 검출을 위한 RT-PCR용 프라이머들의 염기서열

Virus name	Primer	Sequence (5'-3')	Product length (bp)
SBV	SBV-F	ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG	258
	SBV-R	TCT TCG TCC ACT CTC ATC AC	
	KSBV-F	ACC AAC CGA TTC CTC AGT AG	487
	KSBV-R	CCT TGG AAC TCT GCT GTG TA	
	CSBV-F	GGA TGA AAG GAA ATT ACC AG	426
	CSBV-R	CCA CTA GGT GAT CCA CAC T	
ABPV	ABPV-PF	TTA TGT GTC CAG AGA CTG TAT CCA	901
	ABPV-PR	GCT CCT ATT GCT CGG TTT TTC GGT	
DWV	DWV-F	TCA TCT TCA ACT CGG CTT TCT ACG	479
	DWV-R	CGA ATC ATT TTC ACG GGA CG	
BQCV	BQCV-F	TCG TCA GCT CCC ACT ACC TTA AAC	700
	BQCV-R	GCA ACA AGA AGA AAC GTA AAC CAC	
KBV	KBV-F	GAT GAA CGT CGA CCT ATT GA	415
	KBV-R	TGT GGG TGG CTA TGA GTC A	
CBPV	CBPV-F	AGT TGT CAT GGT TAA CAG GAT ACG AG	455
	CBPV-R	TCT AAT CTT AGC ACG AAA GCC GAG	
IAPV	IAPV-F	GATTTG AGA GAT GTA TTT CCT TCT GCG G	725
	IAPV-R	ACACTTGCGTTG GTC CTG AATGTTAAT GG	

SBV: Sacbrood Virus, CSBV: Chinese Sacbrood Virus, KSBV: Korean Sacbrood Virus, APV: Israle Acute Paralysis Virus, ABPV: Acute Bee Paralysis Virus, DWV: Deformed Wing Virus, BQCV: Black Queen Cell Virus, KBV: Kashmir Bee Virus, CBPV: Chronic Bee Paralysis Virus

나. 꿀벌응애에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌 바이러스의 검출

국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에 사양 및 유지되고 있는 봉군 내 응애를 채집하였다. 응애는 꿀벌응애, 중국가시응애를 채집하였다. 꿀벌 성충 몸에 외부기생하는 것을 대상으로 하였다. RT-PCR을 통해 바이러스성 질병의 감염여부와 병원체의 존재여부를 검출하였다.

다. 꿀벌에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌 바이러스의 검출

(1) 꿀벌 성충 (일벌)에서 바이러스 검출

국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에 사양 및 유지되고 있는 봉군을 대상으로 채집하였다. 일벌 성충 중 외부 형태가 날개가 기형 개체와 정상적 날개 모양을 갖춘 개체를 채집하였다. RT-PCR을 통해 바이러스성 질병을 검출하였다.

(2) 수벌에서의 바이러스 검출

국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에 사양 및 유지되고 있는 봉군을 대상으로 수벌 산란 소비를 선택하여 번데기 단계 중 출방 직전의 소비를 선별하였음 선별된 소비에서 수벌의 성충의 날개기형 여부와 외부기생하고 있는 꿀벌용애류를 계수하였다. 또한 수벌 성충을 수거하여 RNA를 분리 추출하여 Deformed wing virus 검출을 위해 RT-PCR를 통해 바이러스성 질병을 검출하였다.

2. 꿀벌바이러스 전파 기작의 연구결과

가. 꿀벌용애에서 RT-PCR법을 이용한 꿀벌바이러스 검출

꿀벌용애에서의 바이러스성 질병을 검출한 결과 Chinese Sacbrood Virus(CSBV), Deformed wing Virus(DWV), Black Queen Cell Virus(BQCV)가 검출되었다. 중국가시용애에서는 바이러스성 질병이 검출되지 않았다(표 1-2).

표 1-2. 꿀벌용애와 중국가시용애에서의 바이러스 검출

	Virus disease								
	Sacbrood viurs			ABPV	DWB	BQCV	KBV	CBPV	IAPV
	CSBV	KSBV	SBV						
<i>V. destructor</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>T. mercedesae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

SBV: Sacbrood Virus, CSBV: Chinese Sacbrood Virus, KSBV: Korean Sacbrood Virus, APV: Israele Acute Paralysis Virus, ABPV: Acute Bee Paralysis Virus, DWV: Deformed Wing Virus, BQCV: Black Queen Cell Virus, KBV: Kashmir Bee Virus, CBPV: Chronic Bee Paralysis Virus

나. 꿀벌성충에서 RT-PCR을 이용한 꿀벌바이러스 검출

일벌에서 바이러스성 질병의 검출은 다음과 같다(표 1-3). 날개기형의 외형의 일벌에서는 Deformed Wing Virus(DWV), Black Queen Cell Virus(BQCV), Kashmir Bee Virus(KBV)가 검출되었다. 비날개기형 외형의 일벌에서는 Deformed Wing Virus(DWV), Black Queen Cell Virus(BQCV)이 검출되었다.

표 1-3. 날개기형과 비날개기형의 일벌에서의 바이러스 검출

	Virus disease								
	Sacbrood viurs			ABPV	DWB	BQCV	KBV	CBPV	IAPV
	CSBV	KSBV	SBV						
<i>Normal deformed wing</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>deformed wing</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+

SBV: Sacbrood Virus, CSBV: Chinese Sacbrood Virus, KSBV: Korean Sacbrood Virus, APV: Israele Acute Paralysis Virus, ABPV: Acute Bee Paralysis Virus, DWV: Deformed Wing Virus, BQCV: Black Queen Cell Virus, KBV: Kashmir Bee Virus, CBPV: Chronic Bee Paralysis Virus

다. 수벌에서의 RT-PCR을 이용한 꿀벌바이러스 검출

수벌에서의 날개기형인 성충은 3마리였으며, 모두 꿀벌응애 또는 중국가시응애가 외부기생하고 있었다. 그러나 날개기형바이러스는 2마리에서만 검출되었다. 정상적 날개 외형의 수벌에서 Deformed Wing Virus(DWV)의 검출은 90%였다. 이들 중 꿀벌응애류가 외부기생하고 있는 것은 47%만이 이루어지고 있었다(표 1-3).

표 1-4. 날개기형과 비날개기형의 수벌에서의 바이러스 검출 및 응애류 감염

No.	Deformed	V.destructor	T. mercedesae	DWV
1	Y		3	
2	N			+
3	N			+
4	N			
5	N			+
6	N			+
7	Y	3	2	+
8	N		2	
9	N			+
10	N	4		+
11	N			+
12	N		5	+
13	N		2	+
14	Y		3	+
15	N	7		
16	N			+
17	N		1	+
18	N	2		+
19	N	4	2	+
20	N		4	+
21	N	4		+
22	N			+
23	N	5		+
24	N	4		

DWV: deformed wing virus

Y: deformed wing adult

N: normal adult

+: detection of deformed wing virus

제 2 절 꿀벌응애 관리를 통한 바이러스 억제

양봉산업에서 심각한 해충으로는 꿀벌응애류이다(우와 이, 1994). 꿀벌응애류는 전 세계적으로 분포 발생하며, 이들에 의한 경제적 손실이 심각하다. 또한 꿀벌응애류는 바이러스성 질병을 매개하여 꿀벌에 이중적 피해를 가져온다(김, 2009).

국내 발생 꿀벌응애류는 총 7종으로 목으로는 2목이 있으며, 중기문, 무기문목이 있다. 중기문목으로는 3과가 있으며, 꿀벌응애, 가시응애, 딱지응애과가 있다. 꿀벌응애과에는 2종이 있으며, 꿀벌응애, 작은꿀벌응애가 있다. 가시응애과에는 3종이 있으며, 중국가시응애, 둥근가시응애, 식물쥐응애가 있다. 딱지응애과는 인도거북등응애가 있다. 무기문목에는 가루응애과 긴털가루응애가 있다(그림 2-1).

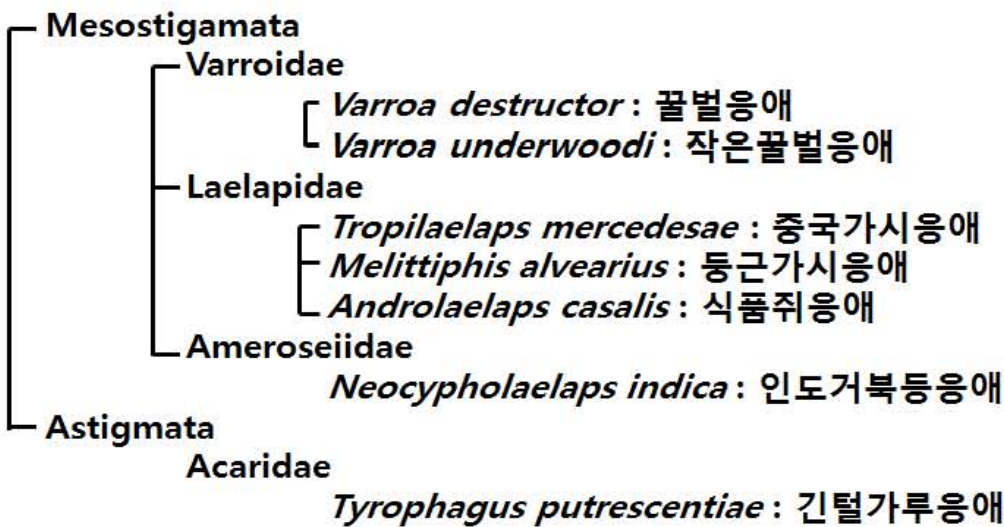


그림 2-1. 국내 벌통에 기생하는 응애류의 분류(Lee et al, 1995).

이중 꿀벌응애, 작은꿀벌응애, 중국가시응애가 꿀벌 외부기생성 해충인 것으로 알려져 있다(이 등, 1995). 꿀벌응애는 1904년 인도네시아 자바에서 동양종꿀벌에 기생한다고 처음 보고 되었다. 이후 1951년 싱가포르, 60년대 홍콩, 필리핀 등지에서 서양종꿀벌에서도 발견되었으며, 이후 전세계적으로 전파되었다. 한국에서는 1950년대 경남 마산에서 발견되었다고 추정하고 있다.

꿀벌응애를 *Varroa jacobsoni* Oudemans 1904년에 명명하였으며, 2000년 Anderson과 Trueman은 국내 꿀벌응애를 *V. destructor*로 분리 명명되었다. 중국가시응애(*Tropilaelaps mercedesae* Anderson and Morgan)는 쥐응애과(Acari: Laelapidae)에 속하며, 가시응애속(Genus: *Tropilaelaps*)의 응애는 사회성 꿀벌류에 기생하며 동남아원산으로 인도최대종 등에 기생하는 것으로 알려져 있다(정 등, 2014).

서양종꿀벌(*A. mellifera*)에서의 기생은 그리 오래되지 않은 것으로 알려져 있다. 국내에서는 1992년 중국으로부터 불법적 봉군 수입을 통해 침입하였다. 이후 전국에서 산발적으로 발생하였으며, 일부 남부지역에서 월동이 가능하다고 알려졌으나, 최근 월동이 가능한 것으로 파악되었다. 또한 국지적, 산발적 발생 양상이 전국적, 지속적으로 발생하여 양봉산업에 심각한 피해

를 주고 있다. 또한 꿀벌응애와 비슷한 생활사를 가지며, 피해양상도 동일하여 꿀벌 건강관리에 각별한 관리가 요망되고 있다.

꿀벌응애류의 방제는 대부분 화학적 방제가 이용되고 있다. 꿀벌응애류 방제에 사용되는 약제는 다음과 같다. 1980~90대에는 훈연지 상태의 약제였다. 훈연지 형태의 약제로는 네오벡스, 신등전, 등전, 진멸지 등을 이용하였다. 1990년대 중반~2000년대는 훈연지를 포함하여 Perizin, Apitol, Apistan, Mavrik, Micut, Beam, Mitac, Bayvarol, 다카르, P2 등이 주 방제 약제로 사용되었다. 2000년 이후 중국의 Wangs가싼 값에 도입되어 많은 양봉농가에서 사용하게 되었으며, 손쉽게 이용할 수 있다는 장점이 있다. 이들 약제 계통은 Pyrethroid, organophosphate로 이루어져 있다. 이들 약제 유효 성분은 Amitraz(Micut, Mitac, Beam), Formic acid(Apicure), fluvalinate(Wangs, Apistan, Mavrik), flumethrin(Bayvarol), coumaphos(Perizin), cymiazol(Apitol) 등이 있다(김, 2009),(표 2-1).

표 2-1. 꿀벌응애 방제에 이용되는 화학적 방제 약제

Class	Active ingredient	Trade name
iminophenyl thiazolidine derivative amadine benzilate essential oil organic acid. organophosphate	cymiazole	Apitol
	amitraz	Micut, Mitac, Baam
	bromopropylate	Folbex-va
	flavonoid	Bienenwohl
	thymol	Apiguard
	thymol, eucalyptol, menthol, camphor	Apilife var
	formic acid	Apicure
	coumaphos	Check mite
		Perizin
	pyrethroid	fluvalinate
P2		
Mavrik		
Soksalman		
Wangs		
Apistan		
flumethrin		

Kim, 2009

꿀벌응애류의 모니터링은 다양한 기법을 이용하여 개체군 밀도 측정이 이루어지고 있다. 가장 많이 사용되고 있는 기법은 끈끈이 판을 이용하여 자연 사망하는 응애 개체를 측정하는 끈끈이판 기법이 있다. 또한 미립설탕을 이용하여 성충 내 기생하는 응애를 분리하는 미립설탕기법이 있다 (표 2-2).

꿀벌응애의 발생 밀도는 연중 시기별로 따라서 차이가 있으며, 시기별로 꿀벌응애류 밀도 조사 방법을 달리해야 한다. 꿀벌응애류 개체군 밀도는 봄에 가장 낮고, 여름 동안에 증가를 하고, 가을에 최고치의 밀도의 변동을 보인다. 벌통 내 발견 가능 장소는 봄철에는 수벌 소방 내에서 발견되며, 여름과 가을에는 성충의 몸에 붙어서 기생한다. 꿀벌응애 밀도 조사 방법 중 간단한 이용과 높은 정확성을 가진 방법으로는 Washing, Sugar shake, Mesh boards, Miticide가 있다. 이 중 Miticide는 화학적 약제를 사용해야 하는 단점을 안고 있다. 본 연구는 꿀벌응애류에 대한 연중 발생 모니터링, 화학적 약제 감수성 및 저항성, 발생 예측 모델을 통해 이들에 대한 종합적 방제 체계가 확립하는 것이다.

표 2-2. 벌통내 기생하는 외부기생성 응애류에 대한 모니터링 기법

Technique	Cost	Test time	Total time	Visits	Sensitivity	Reliability
Bee-visual	nil	1 min	2 min	1	very low	very low
Drone brood	nil	5 min	5 min	1	high	low
Ether roll	low	5 min	5 min	1	low	medium
Washing	low	5 min	5 min	1	high	high
Sugar shake	low	5 min	5 min	1	high	high
Smoke	moderate	5 min	30 min	1	low	low
Mesh boards	moderate	5 min	24 hrs	2	low	high
Miticide	high	2 min	24 hrs	2	very high	very high

MAF in NewZealand, 2001

1. 꿀벌응애 관리를 통한 바이러스 억제 연구방법

가. 꿀벌응애 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가

실험 양봉장에서 관행 사양 관리되고 있는 봉군을 대상으로 약제 감수성 평가를 실시하였다. 꿀벌응애의 밀도가 높은 시기인 9월 초에 실시하였다. 평가 약제는 양봉농가에서 일반적으로 사용되고 있는 약제를 선발하였다. Flouvalinate(왕스 등), Coumafos(페레진), Amitraz(속살만, 마이탁), Formic acid를 추천 농도로 이용하였다. 벌통 내부 바닥에 끈끈이를 넣어 약제 처리 전/후 밀도를 평가하였다. 처리 후 1, 2, 3, 7일에 끈끈이를 넣어주었다. 사망률은 처리 후 1, 2, 3, 7일에 남은 전체 응애수를 전체 개체수로 설정하였으며, 처리 일별 사망률은 처리일별 남아 응애 개체수/전체 남아 응애 개체수로 계수하였다.

나. 꿀벌응애류 방제 방법에 대한 효율 평가

양봉농가에서 이용되는 꿀벌응애의 방제법은 크게 생태적 방제, 화학적 약제 방제가 있다. 이를 이용하여 방제법에 대한 방제 효율을 평가하였다. 9월 초 꿀벌응애의 밀도가 높은 시기에 이루어졌다. 처리구는 화학적 약제 처리구(Flouvalinate), 격왕을 통한 산란억제 유도 후 화학적 방제 처리구, 약제 처리 후 격왕을 통한 산란 억제 유도 후 약제 방제 처리구로 3처리구를 설정하였다. 처리 전 꿀벌응애류의 밀도와 처리 후 밀도를 통해 방제 효율을 평가하였다. 또한 이들 봉군의 꿀벌 개체군 크기를 평가하였다.

다. 꿀벌응애류의 개체군에 대한 연중 발생 모니터링

(1) 모니터링 조사 봉군

경북 의성, 영주, 영천 3지역의 봉군이며 3 또는 4 봉군씩 분양 받아 국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에 사양 및 유지되고 있는 봉군을 대상으로 꿀벌 개체군의 크기와 꿀벌응애류의 개체군 밀도를 조사하였다. 조사는 2014년과 2015년 연중 실시하였으며, 조사간격은 일주일 간격으로 매주 조사하였다.

(2) 설당법을 이용한 꿀벌응애류의 연중 발생 모니터링

설당법은 꿀벌 성충에 외부기생하는 꿀벌응애류의 개체군 밀도를 파악하기 위해 이용된다(그림 2-2). 꿀벌 성충 100마리를 이용하여 플라스틱 통에 넣은 뒤 미립당을 넣고 잘 흔들어 준다. 꿀벌과 미립당을 분리하여 미립당에 의해 꿀벌 성충에 외부기생하고 있는 꿀벌응애류를 계수한다. 2014년 모니터링에서는 각 봉군당 3개의 산란 소비에 착용되어 있는 꿀벌 성충을 이용하였다. 조사 간격은 5월 이후 주 1회 수행하였다. 2015년 모니터링에서는 각 봉군당 3개의 산란 소비에 착용되어 있는 꿀벌 성충을 이용하였음, 조사 간격은 4월 이후 주 1회 수행하였다.

(3) 끈끈이판을 이용한 꿀벌응애류의 연중 발생 모니터링

끈끈이법은 봉군 소문을 통해 끈끈이 판을 이용하여 바닥에 넣어줌으로써 자연 낙마 또는 꿀벌의 청소행동에 의해 낙마되는 꿀벌응애류의 개체군을 파악하기 위해 이용하게 된다(그림 2-3). 끈끈이 판을 저녁 6시 이후 소문을 통해 넣은 뒤 다음날 아침 끈끈이 판을 꺼내서 현미경을 통해 꿀벌응애류를 계수한다. 조사 간격은 2014년 5월 이후 주 1회 수행하였으며, 2015년은 4월 이후 주 1회 수행하였다.

Sugar shaking

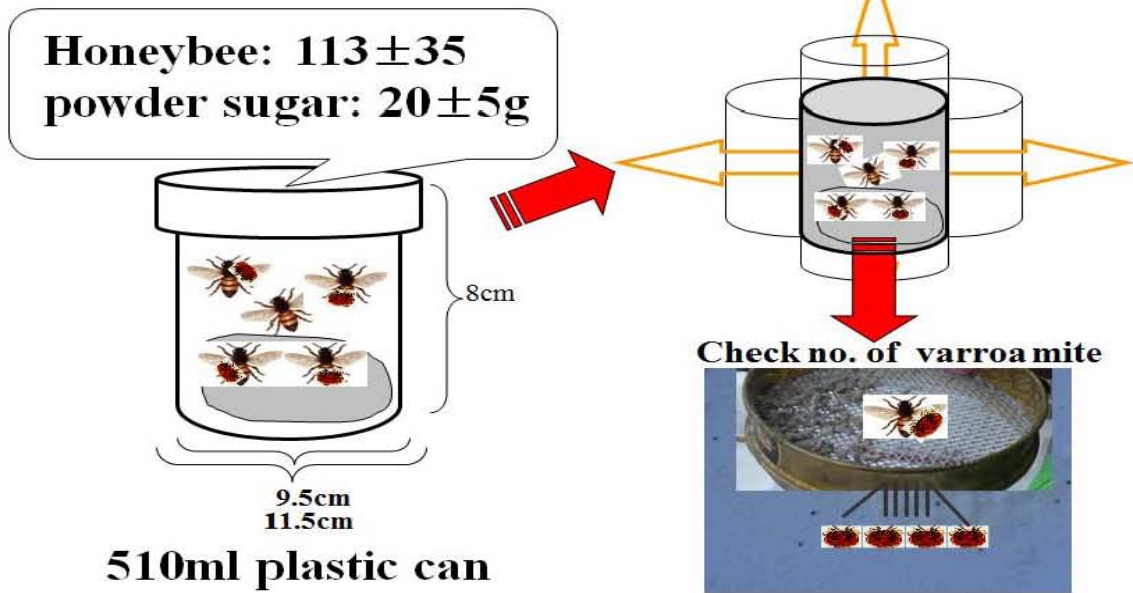


그림 2-2. 설탕을 이용한 응애류 모니터링 기법

1. 소비선택 후 100마리의 꿀벌을 플라스틱통에 넣음, 2. 분말설탕을 20g 넣은 후 10-15초간 좌우, 상하로 흔들어 줌, 3. 꿀벌이 몸에서 분리된 응애류를 계수함.

Sticky method

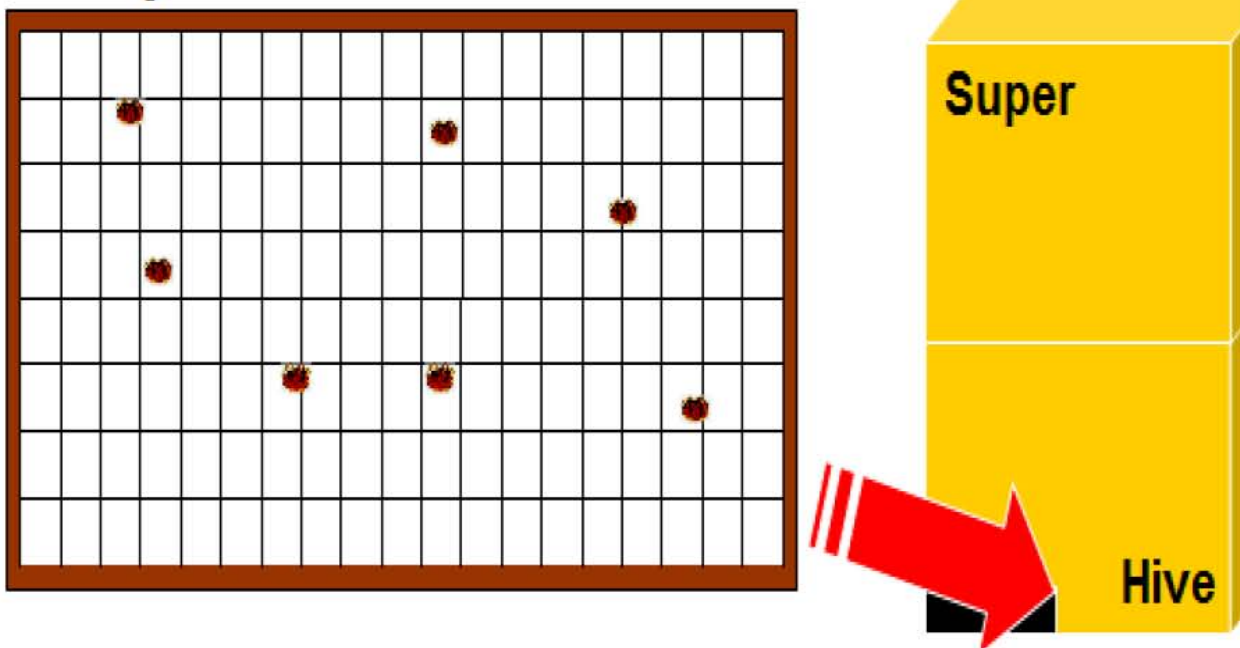


그림 2-3. 끈끈이를 이용한 응애류 모니터링 기법

1. 끈끈이를 벌통 바닥 크기에 맞게 준비, 2. 조사일 저녁 18-19시에 넣음, 3. 다음날 7-8시에 끈끈이 수거 후 응애류 계수함.

(4) 소방 내 꿀벌응애류의 연중 발생 모니터링

모니터링 봉군당 한 개의 산란 소비를 선택하여 소방 100개를 조사하였다(그림 2-4). 산란소방의 발육단계는 산란 후 9일째에 해당하는 전용 단계의 꿀벌을 이용하였다. 소방 내 기생하는 꿀벌응애류는 꿀벌에 편승 후 꿀벌유충에 기생하게 되며 산란 가능 응애이다. 소방 내 기생하는 응애를 계수하였다. 2014년과 2015년 동일하게 조사하였다.

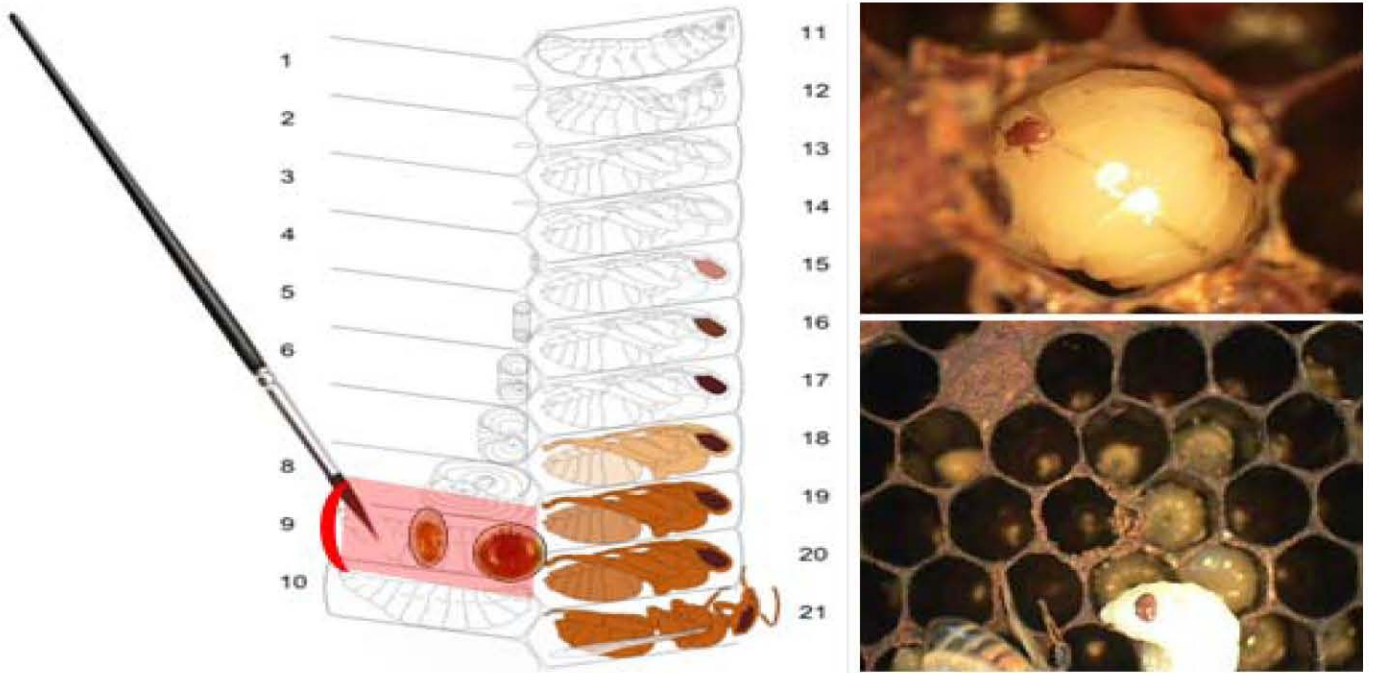


그림 2-4. 소방내 응애류 모니터링

1. 봉개한 소비중 산란 후 9일째 소방을 선별함, 2. 소방을 제거한 후 응애를 계수함

(5) 봉군내 소비 위치 및 일벌과 수벌 산란 소비에서의 꿀벌응애류 발생 평가

설탕법을 이용해 벌통 내 꿀벌응애 선호 서식처를 평가하였다. 평가는 소비 위치에 의한 꿀벌응애의 밀도를 비교하였다. 소비 위치는 안쪽 소비, 중간 소비, 바깥소비를 평가하였으며, 중간 소비는 수벌 소비를 이용하였다.

2. 꿀벌응에 판리클 통한 바이러스 억제연구 결과

가. 꿀벌응에 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가

처리 후 1일차에서는 Amitraz spray가 76%, 다음으로 Coumafos 64%, Amitraz stick 47%, formic acid 31%, Fluvalinate 11% 순이었다(그림 2-5).

처리 후 2일차에는 Amitraz spray가 79%, 다음으로 Coumafos 72%, Amitraz stick 61%, formic acid 37%, Fluvalinate 23% 순이었다(그림 2-5; 그림 2-6).

처리 후 3일차에는 Amitraz spray가 87%, 다음으로 Coumafos 83%, Amitraz stick 70%, Fluvalinate 57% formic acid 56% 순이었다(그림 2-5; 그림 2-7).

Amitraz spray는 속효성 약제로 파악되었으며, Fluvalinate는 지효성 약제로 파악되었다.

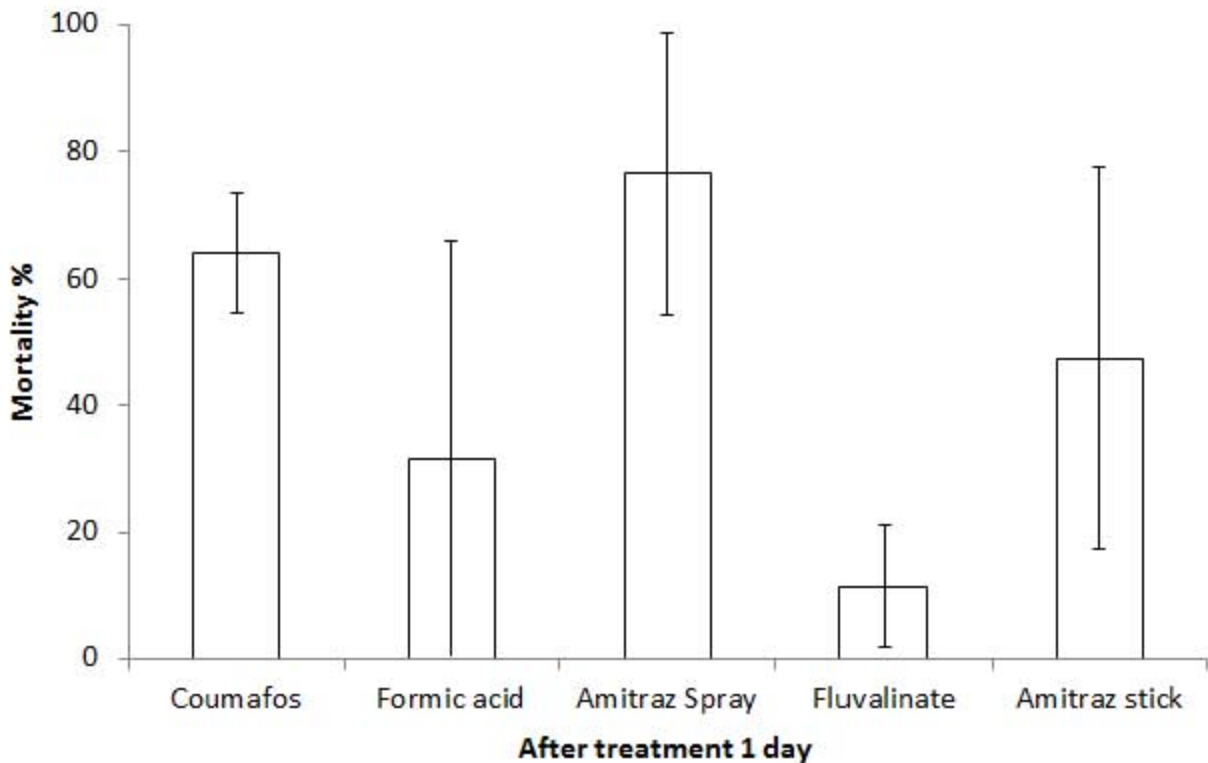


그림 2-5. 꿀벌응에 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가(처리 후 1일차).

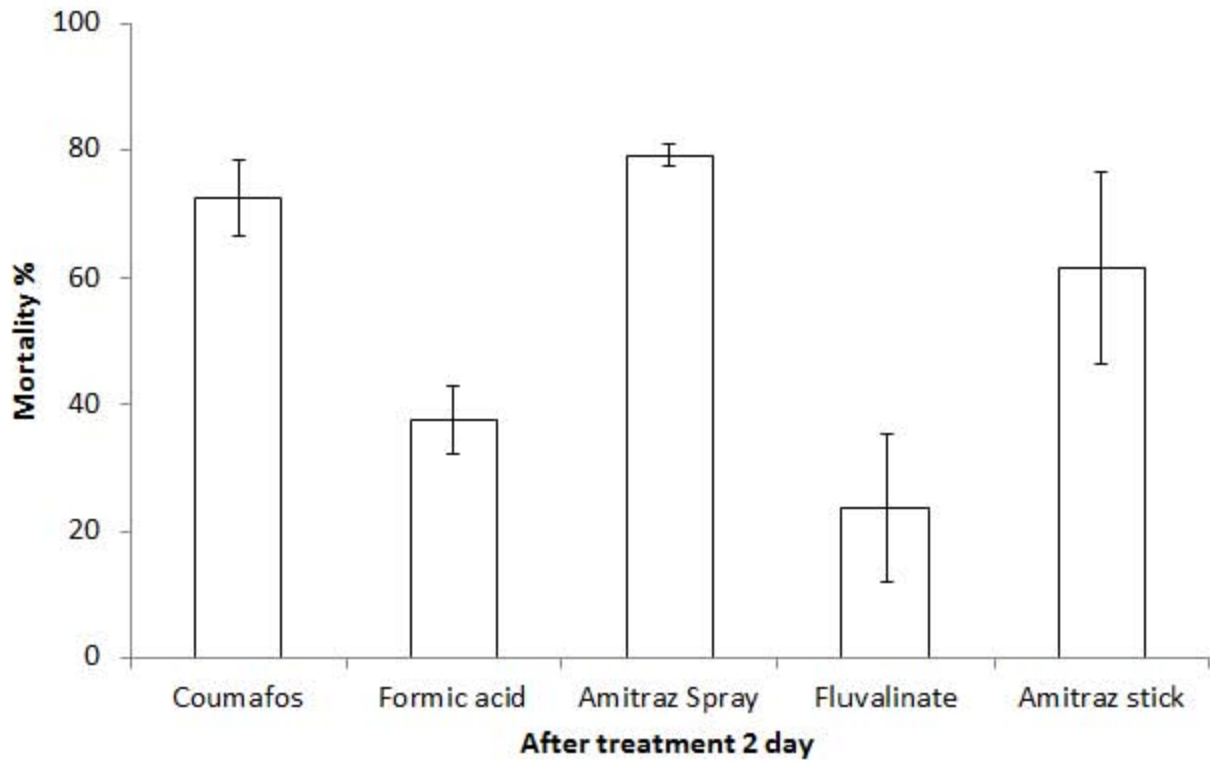


그림 2-6. 꿀벌용에 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가(처리 후 2일차).

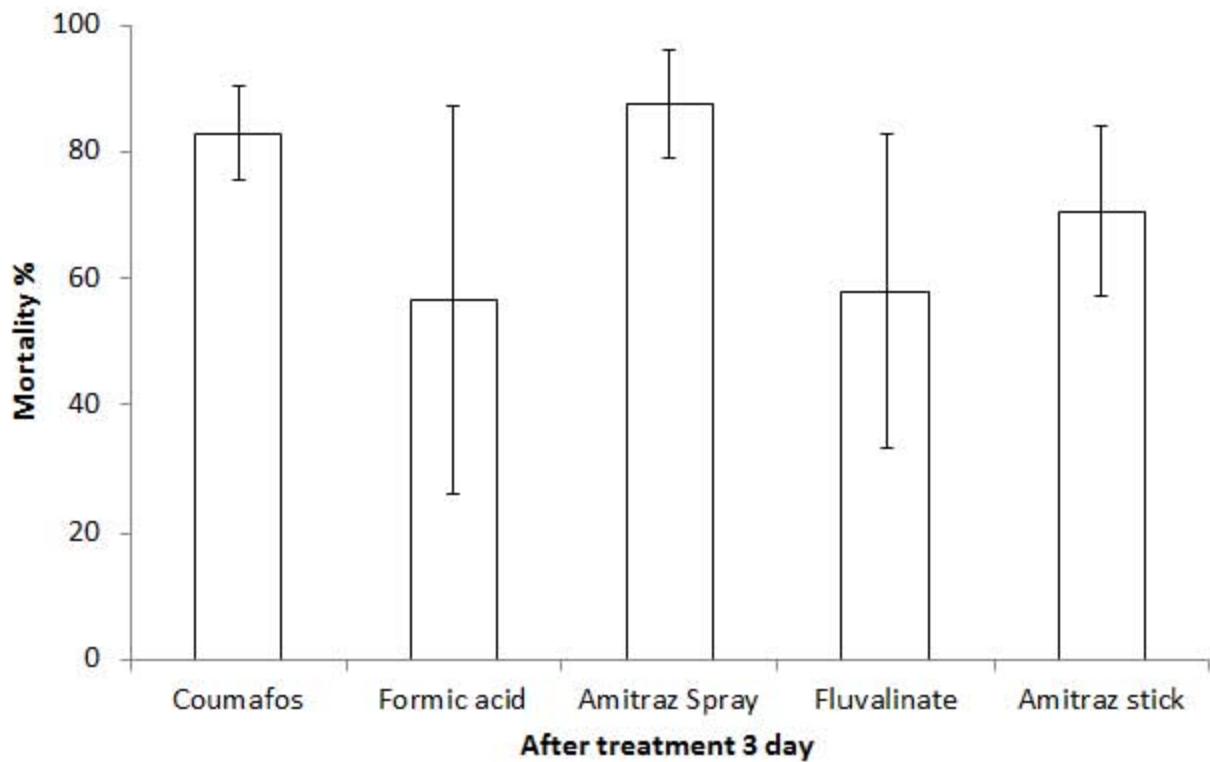


그림 2-7. 꿀벌용에 방제에 사용되고 있는 약제별 효율 평가(처리 후 3일차).

나. 꿀벌용애류 방제 방법에 대한 효율 평가

무처리는 처리 후 꿀벌용애 밀도가 처리 전 밀도 보다 높게 나타났다(그림 2-8).

격왕을 통한 산란억제 유도 후 화학적 방제 처리도 처리 후 밀도가 처리 전 밀도 보다 높게 나타났다. 약제 처리 후 격왕을 통한 산란 억제 유도 후 약제 방제 처리도 처리 후 밀도가 처리 전 밀도 보다 높게 나타났다. 화학적 약제 처리에서는 처리 후 밀도가 처리 전 밀도보다 낮게 나타났다. 또한 꿀벌 개체군을 평가한 결과 화학적 약제 처리에서만 봉군이 사멸하지 않았으며, 그 외 처리에서는 봉군이 사멸하였다. 따라서 꿀벌용애류의 밀도가 높은 시기인 9월에는 약제 처리를 통해 월동 자격 봉군으로 관리해야 함을 알 수 있었다.

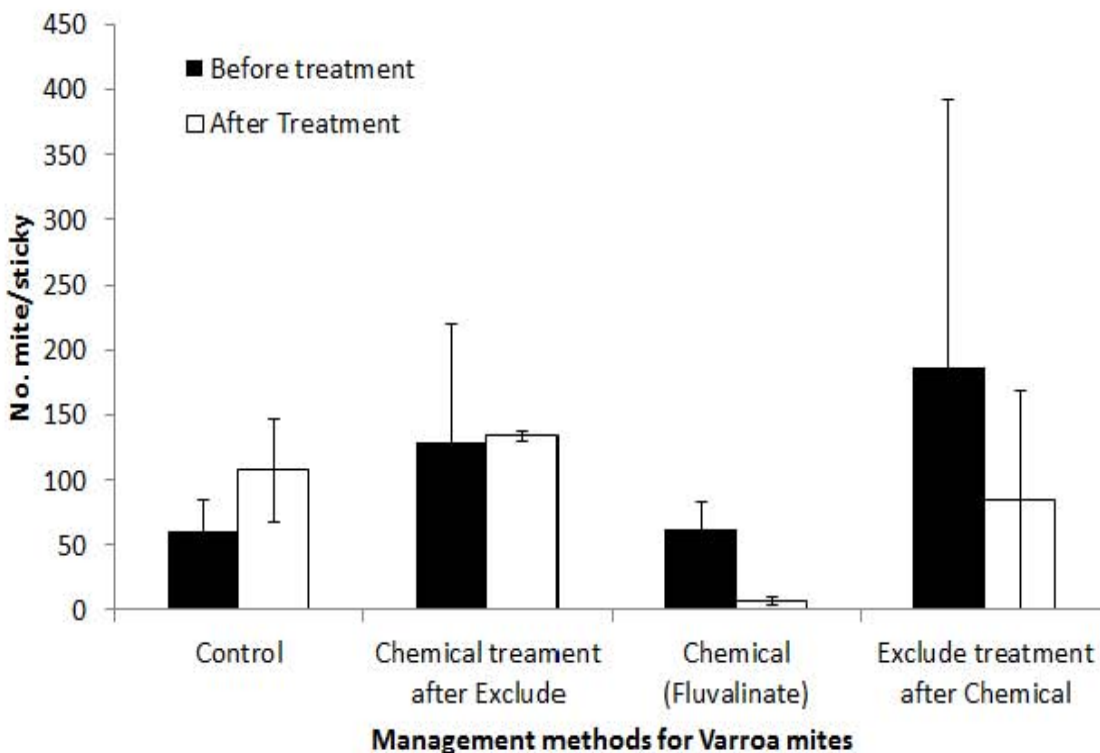


그림 2-8. 꿀벌용애 방제 방법에 대한 평가.

다. 꿀벌응애류의 개체군에 대한 연중 발생 모니터링

(1) 꿀벌 개체군 모니터링

2014년: 영천 4봉군, 의성 3봉군, 영주 3봉군 총 10개의 봉군을 3월 초 양봉농가로부터 분양받은 후 국립안동대학교 실험양봉장에서 사육하였다. 실험에 사용된 봉군은 실험 기간 동안 꿀벌응애류 방제를 위한 어떠한 방제 관리를 하지 않았다. 실험 기간 동안 매주 봉군관리를 하였으며, 봉군의 크기에 따라 소비를 추가 또는 축소하였다. 또한 질병 발생시에도 소비 축소를 통해 강군으로 사육하였으며, 화학적 방제버을 이용하지 않았다. 2014년 꿀벌 개체군 크기는 다음과 같다(그림 2-9).

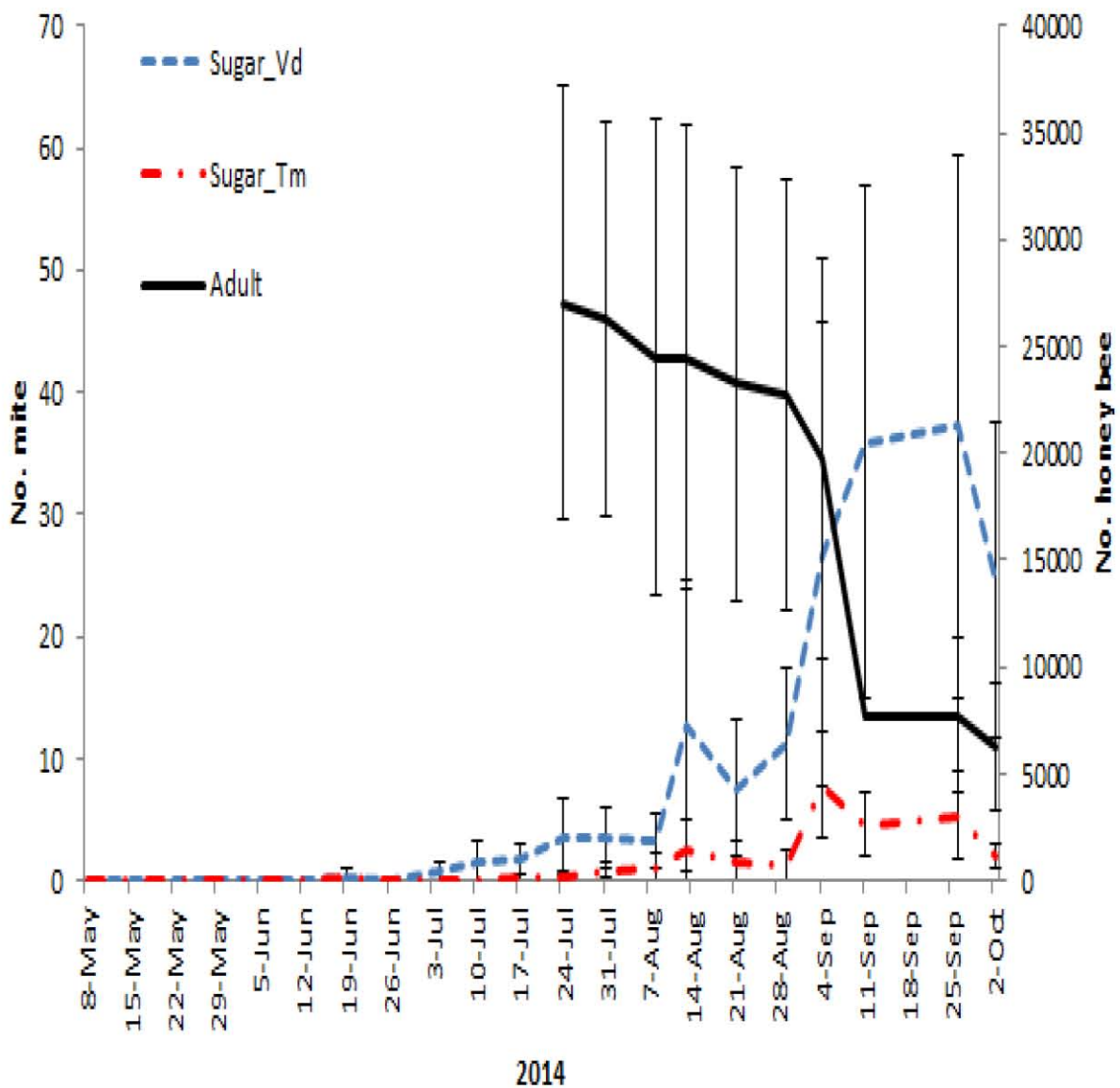


그림 2-9. 2014년 설당법을 이용한 꿀벌응애와 중국가시응애의 발생 모니터링 및 꿀벌 개체군 크기.

조사 봉군의 개체군 크기는 4월 초 5,000마리였으며, 이후 5월과 6월에는 지속적으로 개체군이 증가하였다. 7월 초에는 약 25,000마리까지 증가하였다. 7월 중순부터 꿀벌 개체군은 감소하기 시작하였으며, 10월 초에는 봉군이 전멸하였다.

2015: 3월 초 영천의 양봉농가로부터 10봉군을 분양받은 후 국립안동대학교 실험양봉장에서 사육하였다. 실험에 사용된 봉군은 실험 기간 동안 꿀벌응애류 방제를 위한 어떠한 방제 관리를 하지 않았다. 실험 기간 동안 매주 봉군관리를 하였으며, 봉군의 크기에 따라 소비를 추가 또는 축소하였다. 또한 질병 발생시에도 소비 축소를 통해 강군으로 사육하였으며, 화학적 방제제를 이용하지 않았다. 2015년 꿀벌 개체군 크기는 다음과 같다(그림 2-13).

조사 봉군의 개체군 크기는 4월 초 5,000~7,000마리였다. 이후 5월과 6월에는 지속적으로 개체군이 증가하였다. 7월 중순에는 약 30,000마리까지 증가하였다. 7월 중순 이후부터 꿀벌 개체군은 감소하기 시작하였으며, 9월 초에는 봉군이 전멸하였다.

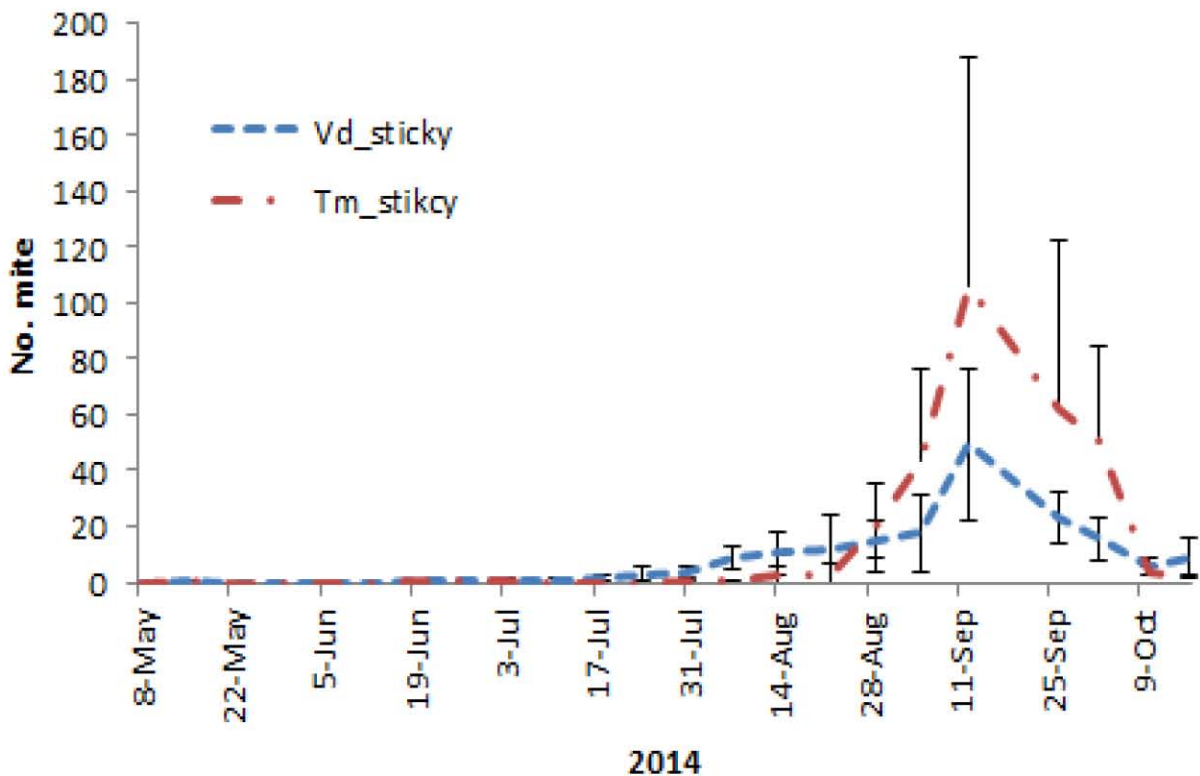


그림 2-10. 2014년 끈끈이벌을 이용한 꿀벌응애와 중국가시응애의 발생 모니터링.

(2) 설당법을 이용한 꿀벌응애류의 연중 발생 모니터링

꿀벌응애

2014: 설당법에 의한 꿀벌응애의 개체군은 5월에는 발견되지 않았다(그림 2-9). 6월 중순부터 발견되기 시작하였다. 이후 꿀벌응애의 개체군 밀도는 지속적으로 증가하였으며, 9월 중순 꿀벌응애 밀도가 가장 높게 나타났다.

2015: 설탕법에 의한 끝벌용애의 개체군은 5월 중순부터 발견되었다(그림 2-13). 6월, 7월 지속적으로 끝벌용애 개체군은 증가하였다. 8월 초 끝벌용애 밀도가 가장 높게 나타났다.

중국가시용애

2014: 설탕법에 의한 중국가시용애의 개체군은 5월에는 조사되지 않았다(그림 2-9). 6월 중순부터 발견되기 시작하였다. 이후 중국가시용애의 개체군 밀도는 지속적으로 증가하였으며, 9월 초 7마리가 계수되었다.

2015: 설탕법에 의한 중국가시용애의 개체군은 5월부터 발견되었다(그림 2-13). 이후 5월과 6월 지속적으로 개체군 밀도는 증가하였으며, 8월 중순에는 5마리가 계수되었다.

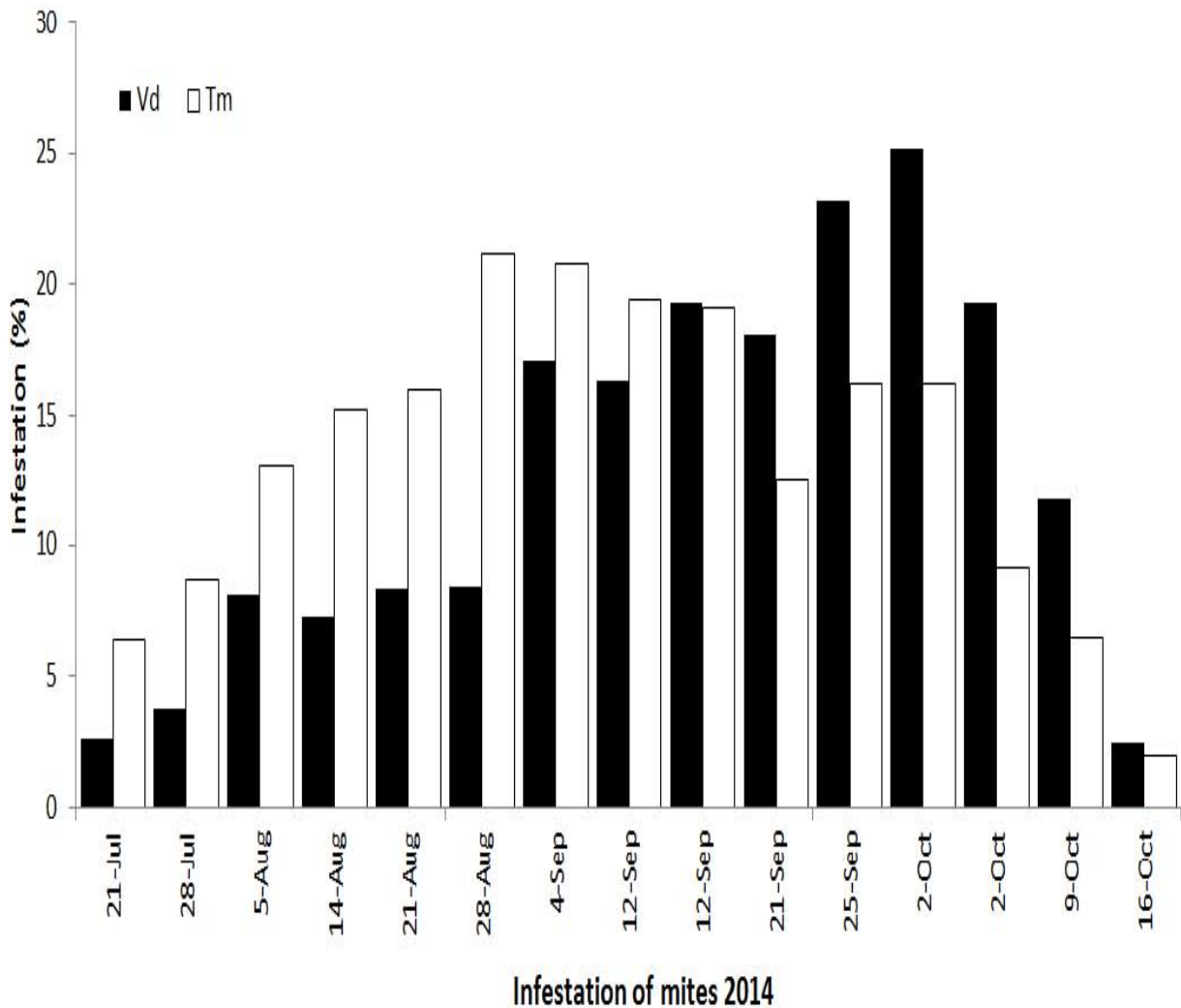


그림 2-11. 2014년 소방내 끝벌용애와 중국가시용애의 기생률.

(3) 끈끈이판을 이용한 꿀벌응애류의 연중 발생 모니터링

꿀벌응애

2014: 끈끈이 판법에 의한 꿀벌응애의 개체군은 5월 중순에 처음 발견되었다(그림 2-10). 이후 6월 중순부터 지속적으로 발견되기 시작하였다. 9월 초 100마리가 조사되었다.

2015: 끈끈이 판법에 의한 꿀벌응애의 개체군은 4월 말에 발견되었다(그림 2-14). 이후 5월, 6월 7월에는 낮은 밀도를 유지하며, 지속적으로 개체군이 증가하였다. 8월 중순에는 50마리가 조사되었다.

중국가시응애

2014: 끈끈이 판법에 의한 중국가시응애의 개체군은 5월 중순에 처음 발견되었다(그림 2-10). 이후 6월 중순부터 지속적으로 발견되기 시작하였다. 9월 초 40마리가 조사되었다.

2015: 끈끈이 판법에 의한 중국가시응애의 개체군은 4월 말에 발견되었다(그림 2-14). 이후 5월, 6월 7월에는 낮은 밀도를 유지하며, 지속적으로 개체군이 증가하였다. 8월 중순에는 40마리가 조사되었다.

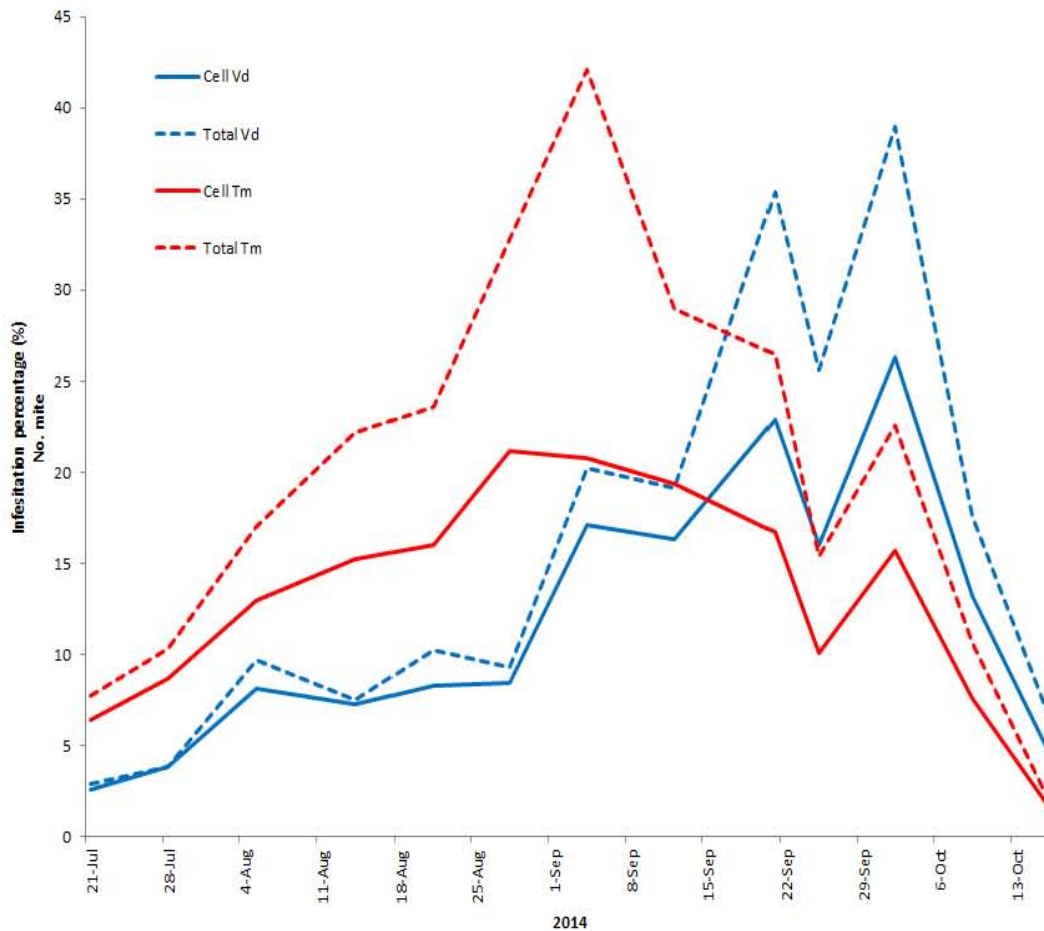


그림 2-12. 2014년 소방내 꿀벌용애와 중국가시용애의 기생률과 총개체수.

(4) 소방 내 꿀벌용애류의 연중 발생 모니터링

2014년

7월 중순부터 기생률을 파악하였다(그림 2-11). 중국가시용애의 기생률이 꿀벌용애보다 높게 나타났다. 9월 초 이후 꿀벌용애의 기생률이 중국가시용애보다 높게 나타났다.

꿀벌용애: 7월 말 이후 지속적으로 기생률이 증가하였다(그림 2-12). 10월 초에 최대 기생률이 나타났으며, 기생률은 약 25%였다. 꿀벌용애가 소방 내 2마리 이상 기생하는 시기는 8월 중순 이후이다(그림 2-12).

중국가시용애: 7월 말 이후 지속적으로 기생률이 증가하였다(그림 2-12). 9월 초에 최대 기생률을 보였으며, 기생률은 약 20%였다. 중국가시용애가 소방 내 2마리 이상 기생하는 시기는 9월 중순 이후이다(그림 2-12).

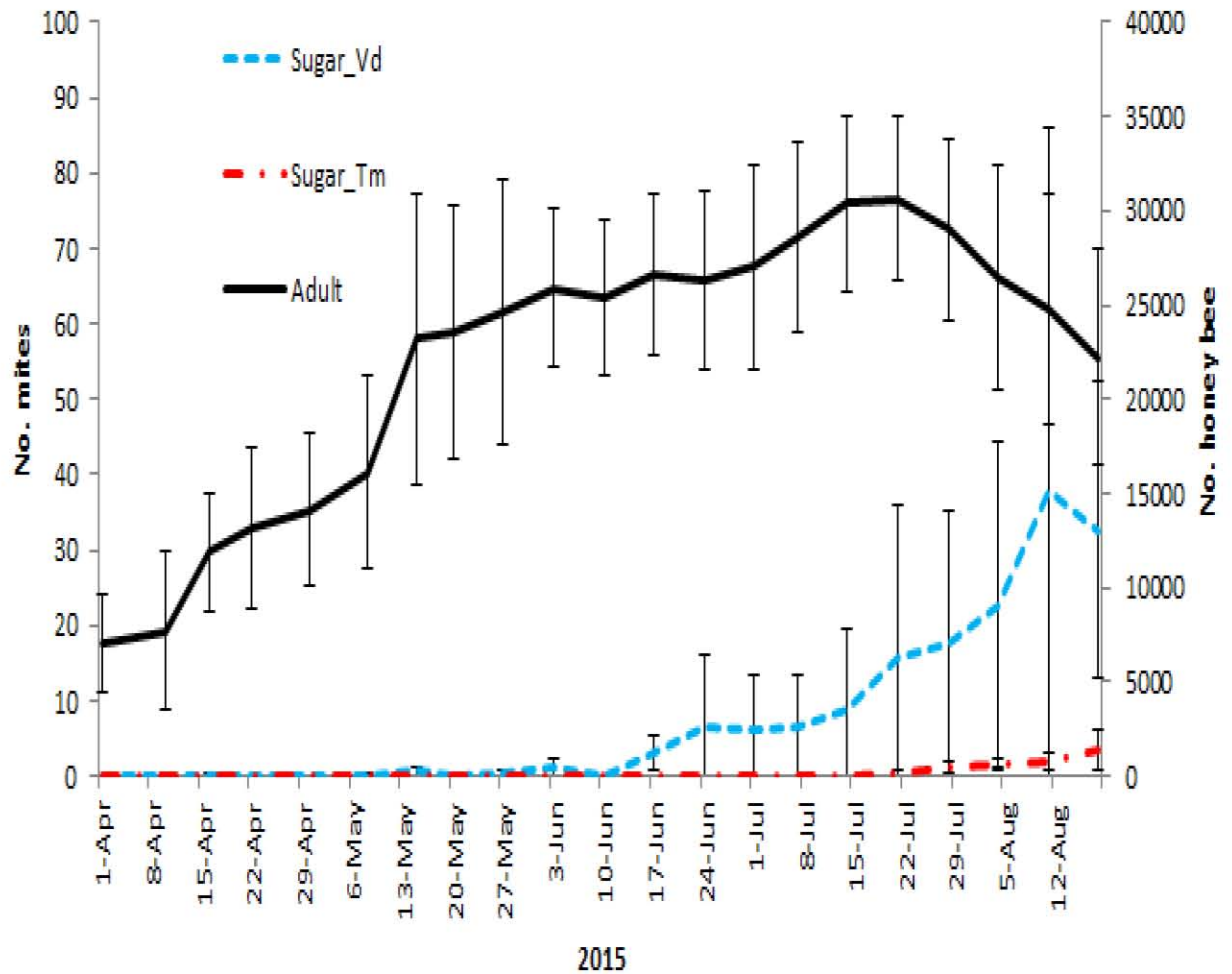


그림 2-13. 2015년 설탕벌을 이용한 꿀벌응애와 중국가시응애의 발생 모니터링 및 꿀벌 개체군 크기.

2015년

꿀벌응애가 가시응애보다 기생률이 높게 나타났다(그림 2-15). 초기 기생에서도 꿀벌응애가 먼저 발생하며, 이후 약 한달 뒤 가시응애는 기생하기 시작하였다. 이후에도 꿀벌응애의 기생률이 가시응애 보다 높게 나타났다.

꿀벌응애: 5월 초부터 기생하기 시작하였다. 이후 꾸준히 기생률이 증가하였으며, 최대 기생률은 약 28%였다(그림 2-16). 꿀벌응애가 소방 내 2마리 이상 기생하는 시기는 7월 말 이후이다(그림 2-16).

중국가시응애: 6월 중순부터 기생하기 시작하였다. 이후 꾸준히 증가하였으며, 최대 기생률은 20%를 넘지 않았다(그림 2-16). 중국가시응애가 소방 내 2마리 이상 기생하는 시기는 8월 중순 이후이다(그림 2-16).

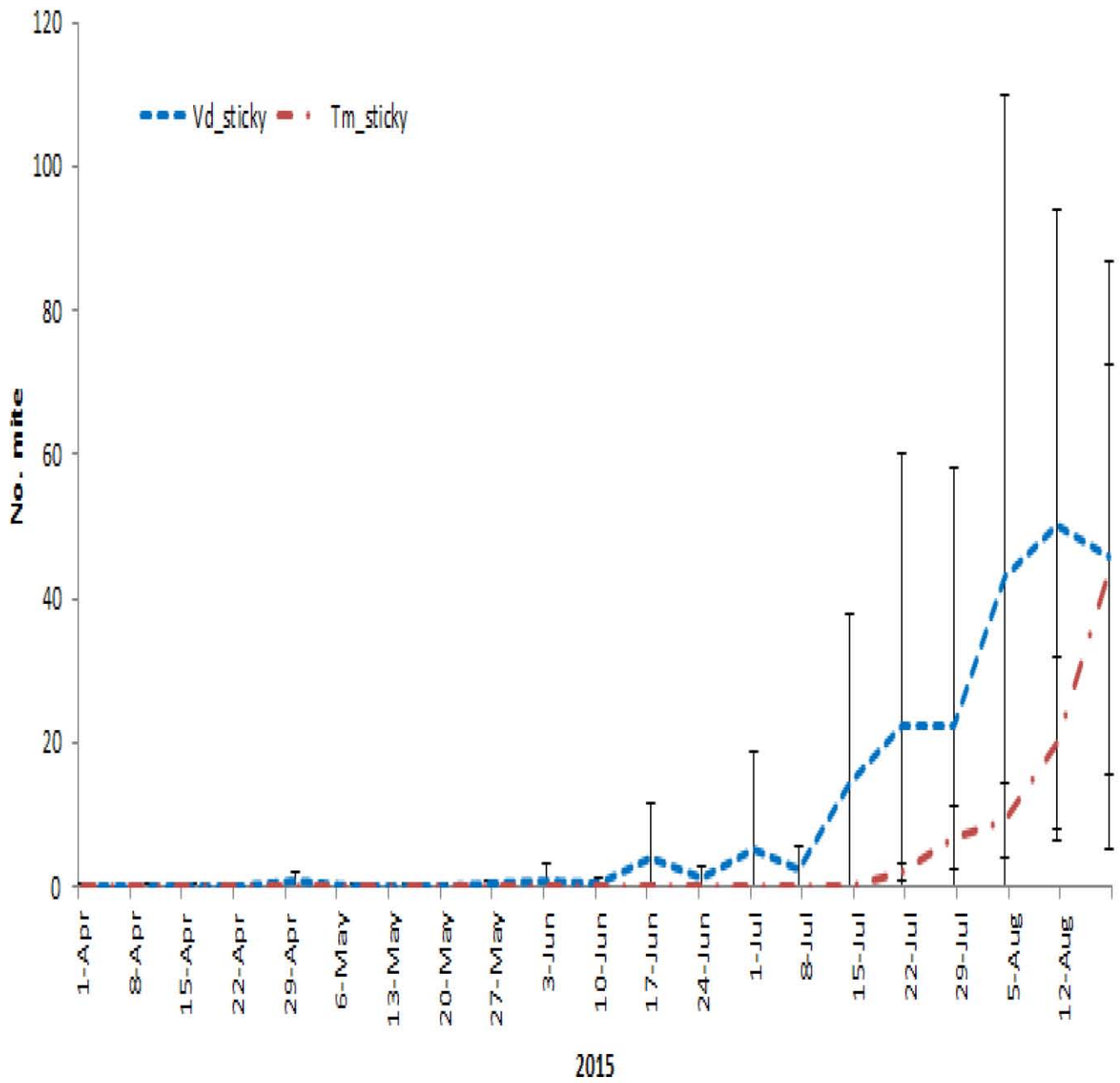


그림 2-14. 2015년 끈끈이벌을 이용한 꿀벌응애와 중국가시응애의 발생 모니터링.

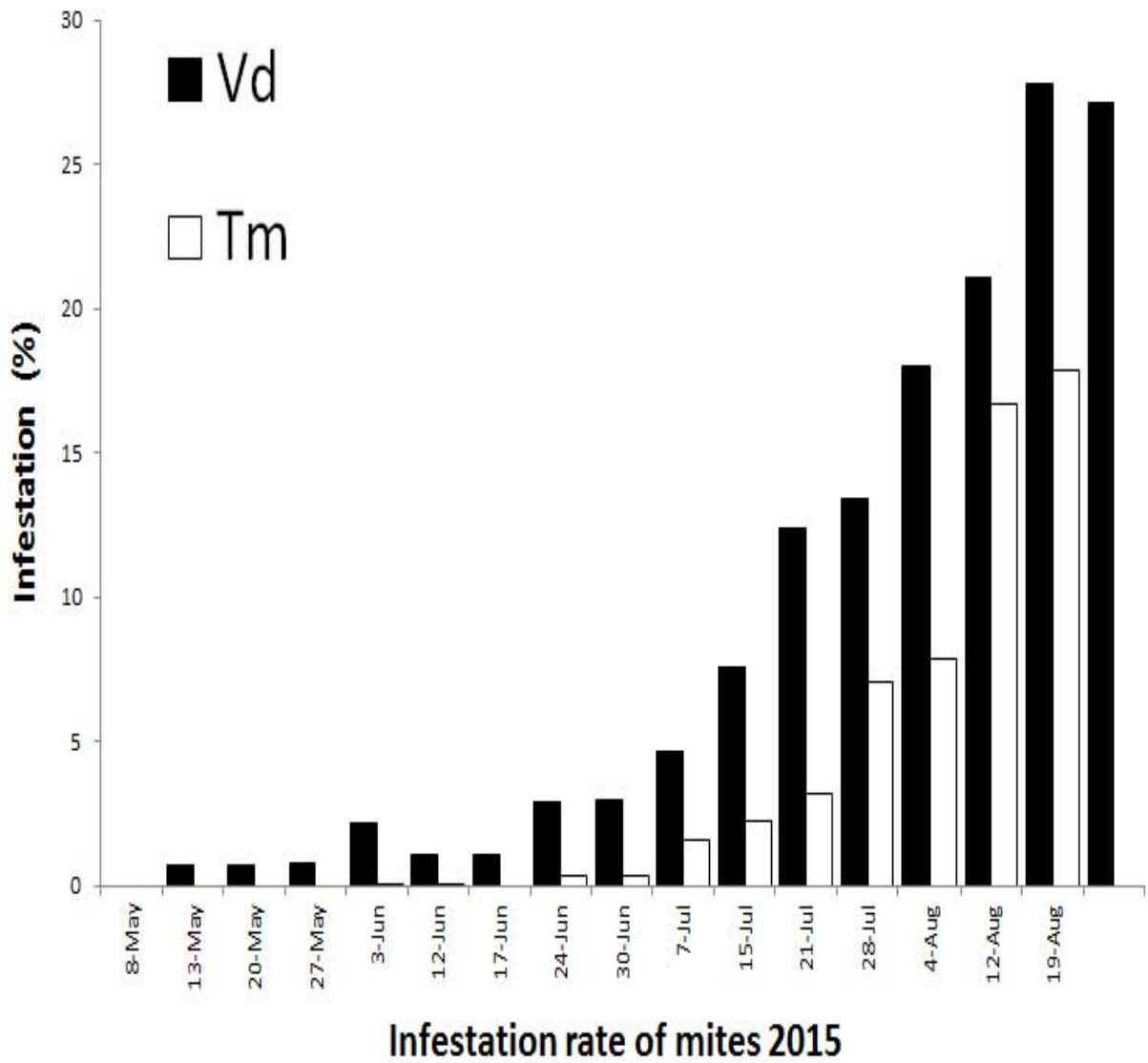


그림 2-15. 2015년 소방내 꿀벌유애와 중국가시유애의 기생률.

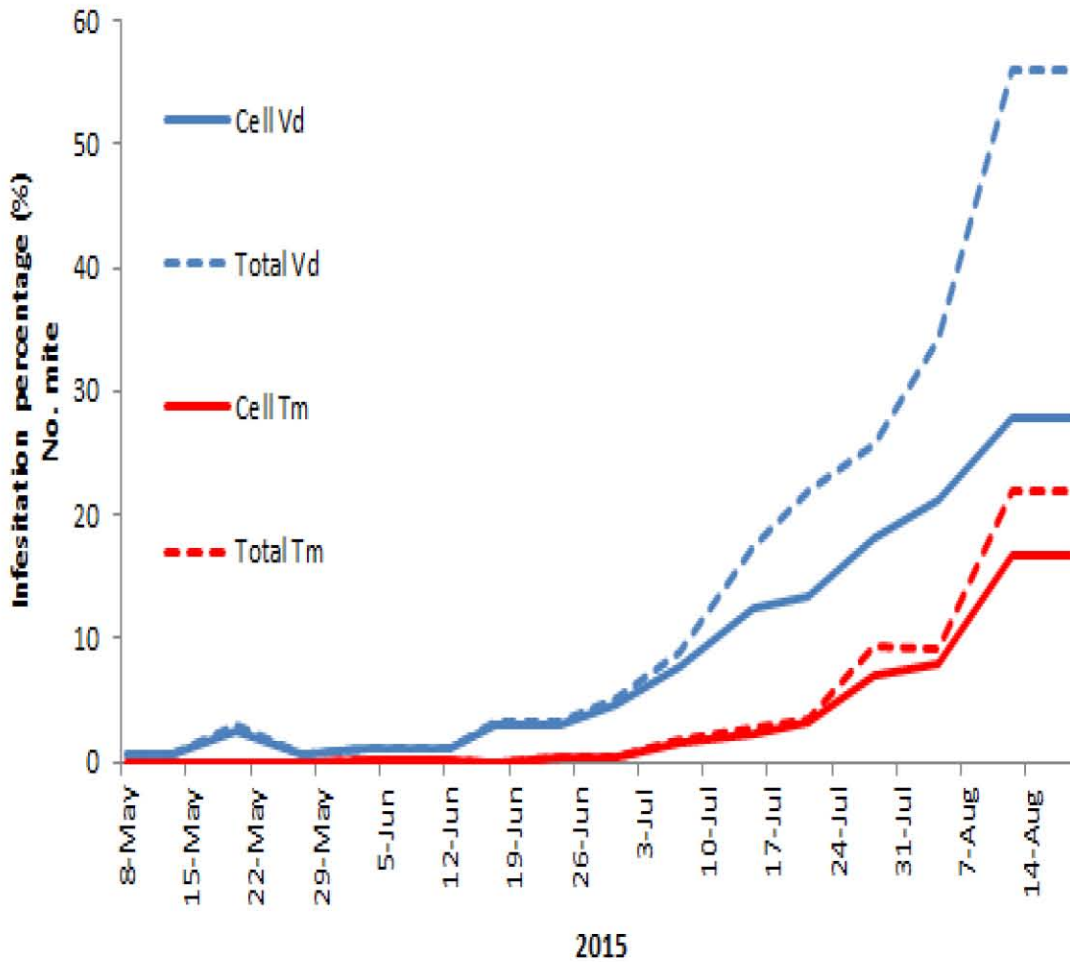


그림 2-16. 2014년 소방내 꿀벌응애와 중국가시응애의 기생률과 총개체수.

(5) 봉군내 소비 위치 및 일별과 수별 산란 소비에서의 꿀벌응애류 발생 평가

설탕법을 이용한 꿀벌응애의 소비 위치에 의한 밀도 평가에서 안쪽 소비, 중간소비, 바깥소비에서는 대부분 중간소비에서 꿀벌응애의 개체군 밀도가 가장 높게 나타났으며, 다음으로 바깥 소비, 안쪽소비 순이었다(그림 2-17).

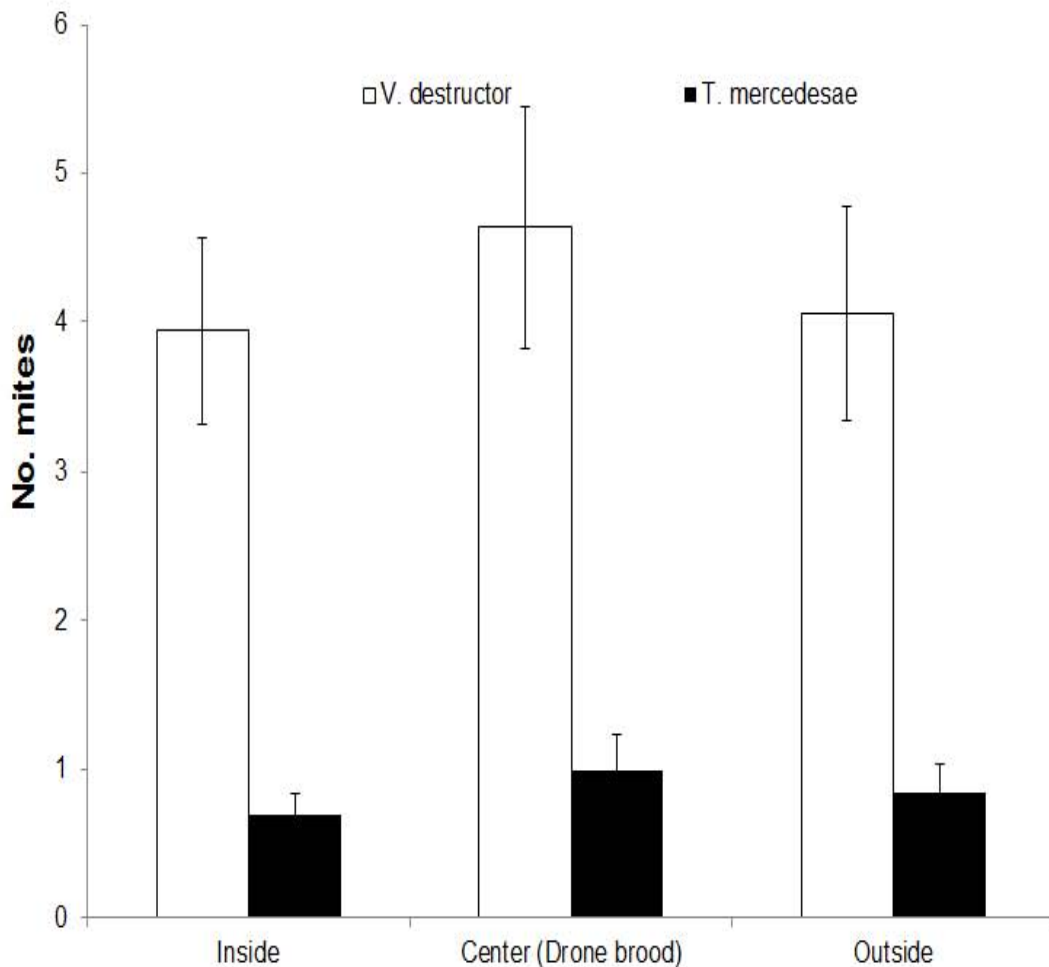


그림 2-17. 소비 위치에 따른 꿀벌용애와 가시용애의 위치별 선호성 비교 (ANOVA, Tukey's test, $P < 0.05$).

중국가시용애의 경우 꿀벌용애 개체군 밀도와 비슷한 경향이 나타났다. 또한 소벌 산란 소비와 일벌 산란 소비에서의 꿀벌용애와 중국가시용애의 개체군 밀도는 수벌 산란소비에서 높게 나타났다. 그러나 수벌 산란 소비와 일벌 산란 소비 간 통계적 차이는 없었다(ANOVA, $df=2, 520, P > 0.7653$).

라. 꿀벌용애의 종합적 방제 체계 확립

(1) 꿀벌의 개체군 동태 변화

우리나라는 온대성 기후에 해당한다. 이런 기후환경에서 꿀벌 개체군은 봄부터 산란을 시작하여 늦가을까지 개체군 크기는 증감을 반복한다. 이후 겨울에는 꿀벌이 월동에 들어가게 된다. 관행적 사양에 의한 꿀벌의 개체군 동태는 다음과 같다. 늦겨울부터(2월 초, 중순) 꿀벌은 월동

을 타파하고 산란을 시작하게 된다. 대부분의 개체군의 크기는 5000-10,000마리 정도의 개체군 크기를 가진다. 이후 지속적인 산란을 통해 개체군 크기를 증가시키며, 유밀기에 맞추어 봉군 형성이 이루어진다.

아카시아 유밀은 5월 중, 하순부터 시작한다. 이때 꿀벌 개체군은 약 30,000마리를 형성하며, 2단 또는 3단 형태의 봉군을 형성하며, 외역벌 형성은 전체 개체군의 2/3을 차지한다. 아카시아 유밀기 이후 봉군을 재 정비하여 초본류 및 기타 목본류의 밀원을 이용한다. 6월 말 또는 7월 초 최대 크기의 개체군을 형성한 봉군은 인위적인 분봉을 통해 개체군 수를 조절하게 된다. 이후 장마기를 거쳐 여름시기를 보낸다. 이후 9월 이후 월동 자격을 갖추 수 있는 봉군형성을 위해 산란을 최대로 유도한다. 11월에는 산란을 억제하여 월동에 들어가게 된다.

(2) 꿀벌용애 개체군 동태 변화

꿀벌용애는 봉군내 꿀벌에 기생하여 월동을 나게된다. 이 시기에 대부분의 꿀벌용애들은 자연 사망이 이루어진다. 이에 따라 늦겨울에는 꿀벌용애의 밀도는 매우 낮으며, 확인하기 매우 어렵다. 꿀벌용애는 꿀벌에 밀도 의존적으로 개체군을 형성한다. 따라서 아카시아 유밀기에 높은 밀도를 형성하며, 7월, 8월 최대 개체군 형성률을 보인다. 이후 개체군은 꿀벌 환경 수용능력이 한계치에 도달하게 되며 꿀벌개체군과 함께 꿀벌용애는 개체군 감소를 하게 된다.

(3) 꿀벌용애 방제법

화학적 방제: 꿀벌 외부기생성 용애류의 방제 관리는 화학적 관리에 대부분 의존하고 있다. 약제 계통으로는 피레스로이드, 유기인계, 벤지레이트, 아마딘 등이 주로 이용되고 있다. 피레스로이드에는 플루바리네이트, 플루메스린 이 있으며, 유기합성에는 코마포스가 있다. 아마딘은 아미트라즈가 있으며, 벤지레이트는 브로모프로피레이트가 있다. 이중 플루바리네이트가 양봉농가에서 흔히 이용된다. 축 사용법, 가격, 효율적 측면이 상대 약제들 보다 높은 효율을 가지고 있다. 그러나 한 약제에 대한 편중적 사용으로 인해 약제 저항성에 대한 문제가 대두되고 있으며, 이를 위해 농민 교육을 통해 개선하고자 하고 있다.

또한 화학적 방제의 일부인 유기자재를 이용하여 방제 관리되고 있다. 대부분 식물추출물 도는 유기산이 사용되고 있으며, 개미산, 옥살산, 프라보노이드 등이 이에 해당한다.

생태적 방제: 생태적 방제는 대부분 꿀벌과 꿀벌용애의 생태를 활용하여 사용된다. 꿀벌용애가 선호하는 수벌소비를 넣어줌으로써 이들을 유인하여 제거하는 것이 대표적이다. 또한 수벌소방을 주기적으로 제거하여 초기 밀도를 억제하는 방법도 이용되고 있다. 인위적인 분봉시기에 여왕벌의 산란을 억제하여 꿀벌용애가 침입할 수 없는 유충 환경을 조성하여 약제처리를 통해 방제하는 방법이 있다. 또한 시트지를 지속적으로 넣어주어 떨어지는 꿀벌용애를 제거하는 방법이 있다. 또한 파우더 설탕을 이용하여 꿀벌 외부에 붙어있는 꿀벌용애를 제거하는 방법이 있다.

(4) 꿀벌용애의 종합적 방제(Integrated Pest Management)

꿀벌응애 방제를 위해서는 우선적으로 꿀벌에 피해가 없으며, 안정적인 방제 효과가 있어야 한다. 한 가지 방제 방법을 통해서만 최적의 방제가 이루어지지 않는다. 따라서 종합적 방제 개념의 도입을 통해 꿀벌응애를 방제해야 한다.

그림 2-18은 Ruffinengo 등(2014)에 의한 꿀벌응애의 종합적 방제체계이다. 이를 바탕으로 국내 실정에 맞게 도입하였다. 늦 겨울-초봄에는 식물추출 오일을 사용하여 초기 방제를 실시한다. 2월 말경 화학적 방제를 실시한다. 아카시아 유밀기 전까지는 꿀벌 개체군 증가에 집중하여 꿀벌을 관리한 후 인위적 분봉과 화학적 방제를 통해 꿀벌응애 밀도를 감소시킨다. 이후 8월 말 또는 9월초 화학적 방제를 실시하여 꿀벌응애밀도를 저감시키며, 10월 말 또는 11월초 유기산을 통해 꿀벌응애를 완전방제 수준까지 도달하여야 한다. 이후 식물추출 오일을 재사용함으로써 최종적으로 꿀벌응애를 방제하여야 한다.

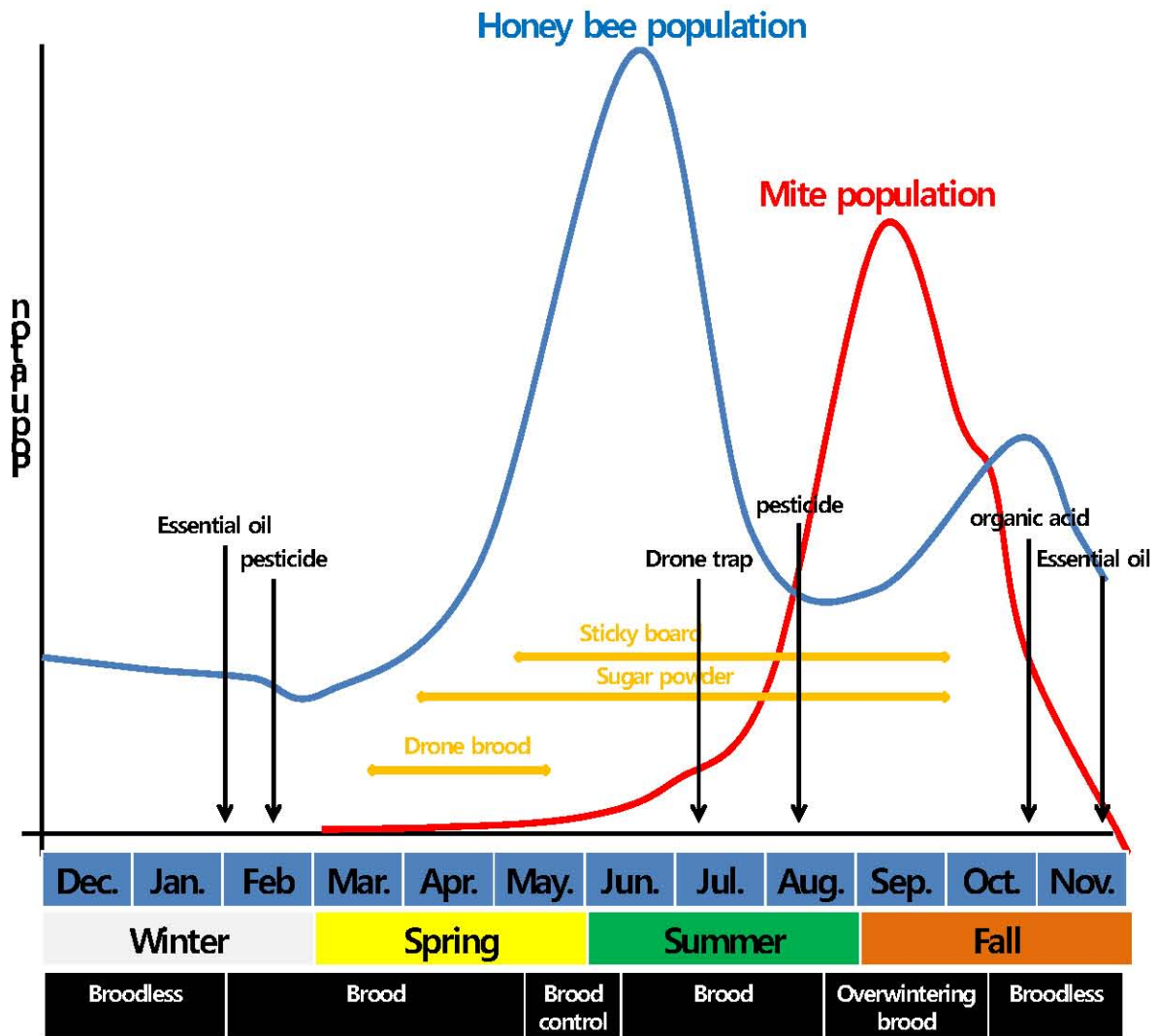


그림 2-18. 꿀벌응애의 종합적 방제 관리체계 (Modify from Ruffinengo et al., 2014).

제 3 절 꿀벌 유충 및 꿀벌응에 실내 사육 기법 개발

꿀벌 유충의 실내 사육은 1933년 Rhein에 의해 처음으로 시도되었으며, 이후 여러 연구자에 의해 체계적인 사육 기법이 확립되었다. 최근 국내에서도 꿀벌 유충 실내 사육 기법이 도입되었다. 꿀벌 유충의 실내 사육을 통해 질병에 대한 전파 기작 등을 위해 이용된다. 본 연구에서는 꿀벌 유충사육을 통해 화학적 약제에 대한 독성평가, 외부기생성 응애류의 전파기작을 연구에 이용하기 위해 실시하였다.

1. 꿀벌 유충 및 꿀벌응에 실내 사육 기법 개발의 연구방법

가. 꿀벌 유충 실내 사육 기법

(1). 일벌 유충 인공먹이 개발

(가) 꿀벌 유충 인공먹이 제조를 위한 장비 및 재료

데시케이터 (Desiccators), 글리세롤, 황산(데시케이터 내 습도 조절용), Laminar flow hood, 항온항습기, 6 cell plate, 이층기, 가는 붓, 킴와이프스 티슈, 에틸알콜, 100 ml beaker, 격왕기, 초저온냉동실, 24 Cell plate, D fructose (F3510, sigmaaldrich.com), D glucose (G7021, sigmaaldrich.com), Royal Jelly, Yeast Extract (212750, Bacto Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company), ddH₂O(그림 3-1)

(나) 꿀벌 유충 인공 먹이 제조

- ① -20℃에 보관된 로얄젤리 50ml를 준비하여 100 ml 비커에 넣은 뒤 비커를 알루미늄 호일로 덮개를 덮은 뒤 4℃에서 서서히 녹임
- ② 6 g D-glucose, 6 g D-fructose, 1 g Yeast Extract, 37 ml ddH₂O를 섞음
- ③ 위 재료를 잘 섞은 뒤 0.22 uM filter를 통해 걸러줌
- ④ 4℃에서 녹인 로얄젤리 50 g을 위의 재료와 잘 섞음
- ⑤ 15 ml Falcon tube에 제조된 꿀벌 유충 인공먹이를 14 ml씩 나누어 담은 뒤 -20℃ 초저온 냉동실에 보관함

(2). 일벌 유충의 선정 및 항온항습기에서의 유충 사육

(가) 꿀벌 유충의 인공사육 과정

- ① 안동대학교 실험 양봉장에서 사육되고 있는 꿀벌(*Apis mellifera* L)에서 여왕벌이 산란을 한뒤 우화 1일차 유충을 선별함
- ② 선별된 유충을 실내에서 24 cell plate에 옮기며, 1 Cell에 1개의 유충을 이식함. Cell 바닥에 그물망 천을 Cell

크기에 맞게 잘라 갈아 놓음

- ③ Cell plate를 테시케이터에 넣은 뒤 인큐베이터에 넣음 인큐베이터의 조건은 $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도와 $90\pm 5\%$ 상대습도를 테시케이터 내 K_2SO_4 를 이용하여 조절함
- ④ 유충 발육 기간동안 인공먹이는 매일 10 ul씩 제공하였음
- ⑤ 유충이 번데기로 발육하기 직전 24 cell plate 내 유충을 각각 한 Cell로 옮긴 뒤 인큐베이터 내 테시케이터 $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ 온도와 $75\pm 5\%$ 조건에 보관함

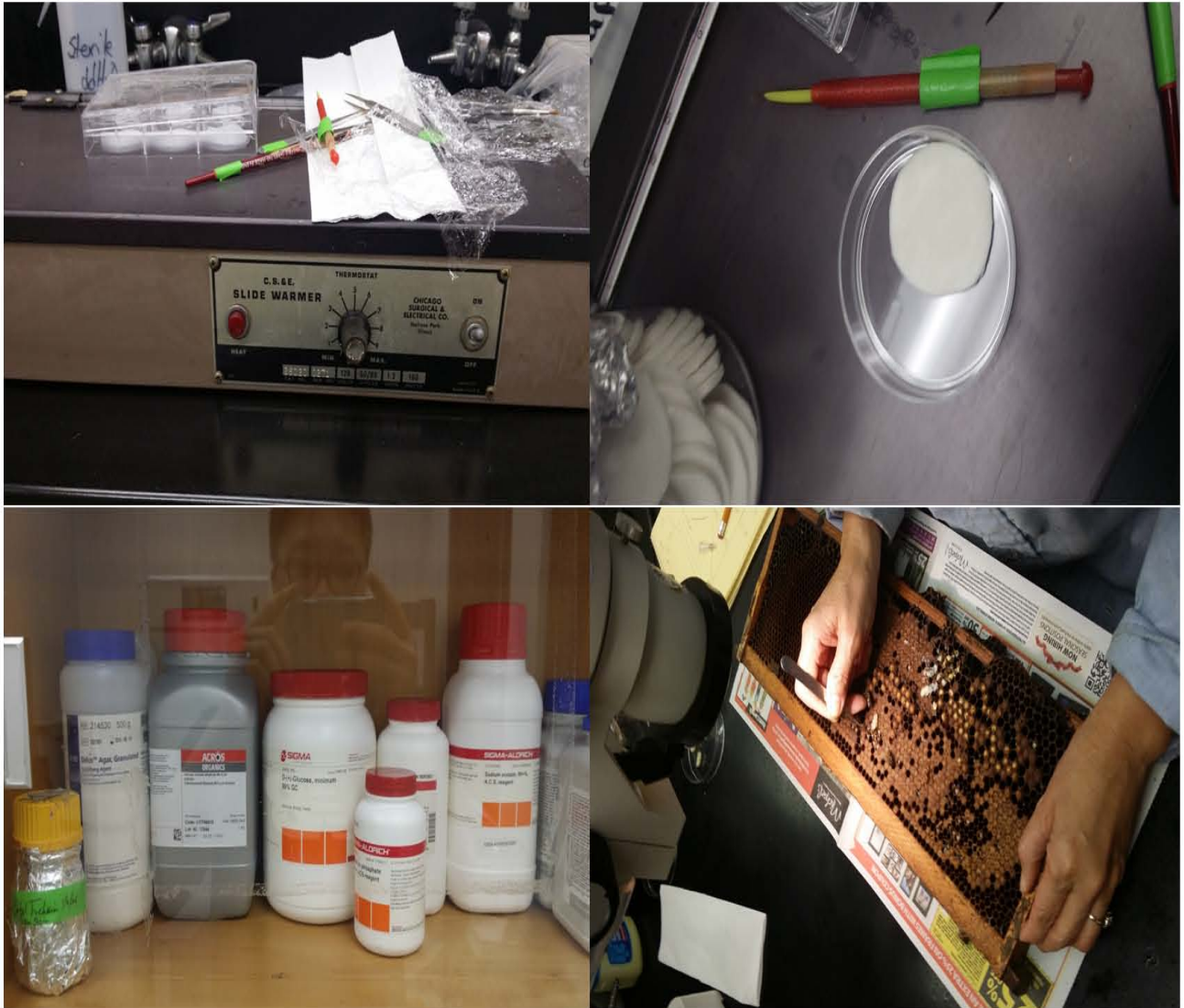


그림 3-1. 꿀벌 유충 인공먹이 제조를 위한 장비 및 재료.

(나) 꿀벌 유충 인공 먹이량에 따른 우화율 평가

꿀벌 유충을 이충시 먹이의 양을 달리하여 성충으로 우화율을 평가하였다. 처리구는 200, 100, 50, 30 ul 씩 처리 하였다. 모든 처리구는 처리 후 10 ul씩 인공먹이를 24시간 간격으로 매일 제공하였다. 이후 유충의 생존 유무를 평가하였다.

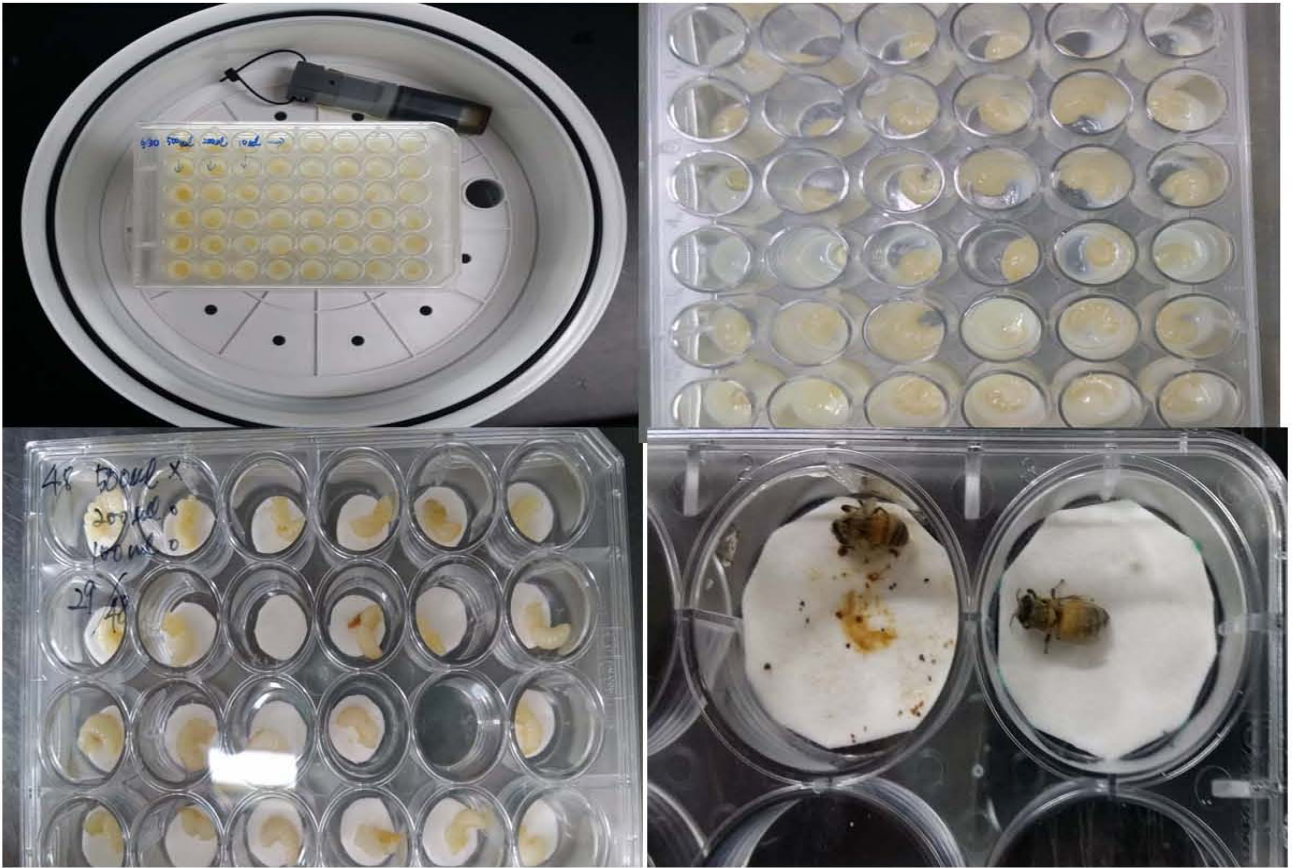


그림 3-2. 꿀벌 유충의 인공사육 과정.

나. 꿀벌응애 사육 시스템 개발

(1). 꿀벌응애 채집을 통해 야외 개체군 확보

경상북도 내 양봉농가를 대상으로 2014년과 2015년 꿀벌응애류 시료를 채취하여 존재 유무를 확인한 뒤 봉군을 분양 받았다. 분양받은 지역은 의성, 영주, 영천 세 지역의 꿀벌 봉군이며 3 또는 4 봉군씩 분양 받아 국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에 사양 및 유지하고 있다.

(2) 일벌 유충 실내 사육 개발을 통한 꿀벌응애 이식 및 계대 사육

국립안동대학교 곤충생태연구실 실험 양봉장에서 사양되고 있는 봉군에서 꿀벌응애를 채집하였다. 꿀벌응애의 시류 채집은 꿀벌 발육 단계가 번데기에 들어가 산란을 하지 않을 꿀벌응애를 채집하였다. 채집된 꿀벌응애는 항온항습기(33℃, RH 55-60%)에서 페트리디쉬에 물 티슈를 깔아준 뒤 꿀벌응애를 최대 24시간까지 보관하였다.

꿀벌응애의 기주인 꿀벌 유충의 실내 사육 기법의 확립을 통해 항온항습기에서 사육중인 꿀벌 유충을 이용하여 꿀벌응애를 사육하였다. 꿀벌응애의 접종은 알에서 8-9일 된 유충에 접종하였다(그림 3-3)

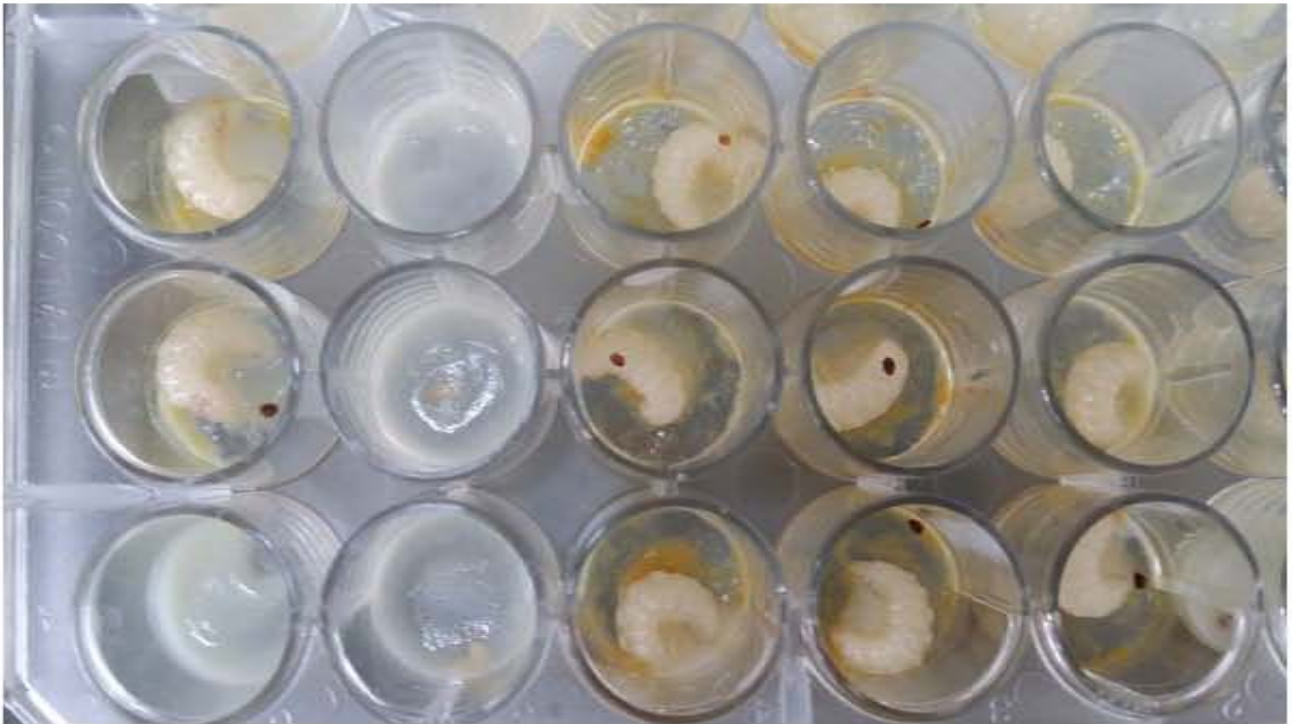


그림 3-3. 알벌 유충 실내 사육 개발을 통한 꿀벌응에 이식 및 계대 사육인공.

2. 꿀벌 유충 및 꿀벌응에 실내 사육 기법 개발의 연구결과

가. 꿀벌 유충 인공 먹이량에 따른 우화율 평가

꿀벌 유충에 대한 이충 시 인공 먹이량을 다르게 처리함으로써 꿀벌 유충에서 상충으로의 우화율 평가는 다음과 같다(표 3-1). 200, 100, 50, 30 ul 씩 처리한 처리구의 유충에서 성충으로의 우화율은 각 50, 43, 44, 42% 나타났다. 200, 100, 50, 30 ul 씩 처리한 처리구의 유충에서 번데기 단계까지의 생존율은 각 72, 63, 70, 70% 나타났다. 또한 번데기에서 상충으로 우화율은 63, 72, 63, 60% 나타났다.

꿀벌 유충을 이충 후 먹이 제공량에 따른 우화율은 200 ul가 가장 높은 우화율이 나타났다. 또한 유충에서 번데기 단계까지의 생존율도 200 ul가 가장 높은 생존율을 나타냈다. 그러나 번데기에서 상충 단계에서는 100 ul가 가장 높은 우화율을 나타냈으며 다음으로 200 ul 순이었다. 그러나 각 발육단계에 대한 처리구의 통계분석 결과 값들은 유의하지 않았다(표 3-1).

표 3-1. 인공먹이양에 따른 꿀벌 유충의 우화율(ANOVA, Tukey's test, $P<0.05$)

Feed amount (ul)	Replication (n=24)	Emergence rate (%)			
		Larvae - pupa	Pupa - Adult	Larvae - Adult	
200	1	45.8	72.7	33.3	
	2	83.3	50.0	41.7	
	3	100.0	62.5	62.5	
	4	62.5	80.0	50.0	
	5	66.7	87.5	58.3	
	6	66.7	75.0	50.0	
	7	83.3	70.0	58.3	
	8	75.0	94.4	70.8	
	9	79.2	63.2	50.0	
	10	62.5	46.7	29.2	
		Mean±SE	72.5±4.99	69.5±5.07	50.4±4.32
100	1	75.0	61.1	45.8	
	2	70.8	94.1	66.7	
	3	45.8	81.8	37.5	
	4	75.0	72.2	54.2	
	5	62.5	73.3	45.8	
	6	75.0	66.7	50.0	
	7	75.0	66.7	50.0	
	8	54.2	61.5	33.3	
	9	66.7	75.0	50.0	
		Mean±SE	60.0±3.76	72.2±3.71	43.3±3.38
	50	1	70.8	58.8	41.7
2		87.5	66.7	58.3	
3		83.3	55.0	45.8	
4		37.5	77.8	29.2	
5		83.3	65.0	54.2	
6		66.7	81.3	54.2	
7		62.5	60.0	37.5	
8		87.5	52.4	45.8	
9		58.3	78.6	45.8	
10		66.7	50.0	33.3	
		Mean±SE	70.4±5.26	63.3±3.78	44.5±3.14
30	1	79.2	52.6	41.7	
	2	62.5	60.0	37.5	
	3	70.8	70.6	50.0	
	4	75.0	72.2	54.2	
	5	75.0	72.2	54.2	
	6	75.0	44.4	33.3	
	7	66.7	93.8	62.5	
	8	66.7	37.5	25.0	
	9	62.5	33.3	20.8	
	10	75.0	61.1	45.8	
		Mean±SE	70.8±1.96	60.0±6.15	42.5±4.48

제 4 절 꿀벌응애의 방제를 위한 친환경 약제의 개발

양봉산업을 영위하는 과정에서 발생하는 병해충은 양봉생산성을 저해하고 산물의 품질을 떨어뜨리는 결과를 초래한다. 대표적인 꿀벌 해충으로 꿀벌응애류(바로아디스트릭트, 트로필라스 크라레), 꿀벌부채명나방이 있으며, 이 중에서 꿀벌응애는 세계적으로 분포가 확대되었으며 양봉산업에 심각한 피해를 주는 외부기생 해충으로, 꿀벌의 유충, 번데기 및 성충에 기생하면서 체액을 빨아먹는다. 이로 인하여 꿀벌은 정상적인 발육을 하지 못하며 정상 활동을 할 수 없고, 발생이 심하면 봉군의 세력이 크게 약화되어 폐군에 이르게 된다.

이러한 꿀벌응애의 방제를 위하여 사용되고 있는 약제 중, 세계적으로 플루바리네이트 및 플루메트린 계열의 유기합성 살비제에 대한 저항성 개체가 출현하고 있어 방제가 점차 어려워지고 있는 실정이며 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 생산 양봉에서 꿀벌에 가장 위협이 되고 있다.

꿀벌응애는 1960년대에 발생이 확인된 이후 국내 꿀벌에 만성적으로 기생하고 있는데, 1990년대 중반에 외국에서 유입된 중국가시응애와 더불어 국내 양봉산업에 가장 큰 피해를 주고 있다. 꿀벌응애(바로아 디스트릭트)의 경우에는 꿀벌 번식시기에 응애암컷의 수명은 성충벌의 수명과 비슷한 4~8주 정도이나, 시기에 따라 여름에는 2~3개월, 가을에는 5~8개월, 겨울동안에는 6~8개월 등으로 차이가 난다. 성충 꿀벌에 월동하는 동안 암컷 응애는 주기적으로 부드러운 복부의 첫 번째와 두 번째의 마디사이의 얇은 막을 통하여 혈액을 빨아먹는다. 일벌 성충에 대한 기생률은 이른 봄과 늦가을에 높고 번식기에는 낮다. 벌방 내 기생률은 봄부터 가을까지 계속 높아지며, 일벌 방보다 수벌 방에서 3~10배 정도 높은 것으로 알려져 있다.

중국가시응애(트로필라스 크라레)의 크기는 1.0mm이고 체색은 적갈색을 띠며 체형은 장축이 긴 타원형을 하고 있으며 비교적 빨리 움직인다. 중국가시응애의 감염여부는 체구가 작아 확인하는 것이 쉽지는 않다. 꿀벌응애와 마찬가지로 감염된 봉군에서는 날개가 비정상적인 불구벌이 나타나며, 특히 심하게 감염된 벌방의 번데기는 복부가 줄어들고 검은색을 띠게 된다. 중국가시응애의 생활사는 꿀벌응애와 비슷하다. 벌방의 유충이 봉개되기 전에 수정된 암컷이 벌방에 들어가 기생하면서 봉개 후 약 2일에 산란을 하며, 유충이 발견되는 시간은 봉개 후 대략 2.5일이 지나면 볼 수 있다. 한 개의 벌방에 3~4개의 알을 낳으며, 알에서 성충까지의 발육기간은 약 6일이다. 성충의 최적 온도는 31~36℃이며, 짧고 긴 모양의 형태적 특징으로 벌들과 벌집사이 또는 꿀벌의 털 사이를 쉽게 오갈 수 있도록 되어 있다.

벌통 내 전체 꿀벌응애 수를 개략적으로 알기 위해서는 흰색 시트지(접착식 벽지)를 벌통 바닥에 깔고 하루가 지난 후에 벌통바닥에 있는 끈끈한 시트지를 꺼내어 자연 사망하는 응애를 관찰하면 된다.

꿀벌응애류(바로아디스트릭트, 트로필라스 크라레)의 방제를 위한 기존 사용 방법으로는 현재 플루바리네이트, 플루메트린, 아미트라즈, 브롬프로피레이트 등 약제방제를 주로 이용하고 있

으며, 처리방법으로는 훈연, 분무, 급이, 접촉 등이 있다. 훈연 처리시에는 약제의 독성으로 인한 중독의 위험이 있어서 훈연연기를 맡지 않게 조심하여야 하며 분무처리 시에도 약제를 흡입하지 않도록 마스크를 착용하여야 하며, 급이 시에는 약제가 벌꿀에 잔류될 가능성이 더욱 높으므로 각별한 주의가 필요하다.

현재 가장 많이 사용되고 있는 플루바리네이트, 플루메트린을 이용한 접촉용 스트립 형태의 약제는 벌들의 활동이 활발한 시기에 효과적이며 기온이 떨어진 시기에는 효율성이 떨어지며 벌집에 직접적 접촉은 반드시 피해야 한다. 국내 꿀벌응애에 대한 방제 시기는 월동 전후인 가을과 봄철에 처리하고, 봉군의 이동이 가장 많은 아카시아채밀 이후 발생여부에 따라 추가 처리하면 효과적으로 방제된다.

그러나 유럽에서는 꿀벌응애의 약제 저항성에 대해 조사한 바 있는데, 플루바리네이트에 대해 감수성인 세 지역의 꿀벌응애에 비해 저항성인 두 지역에서는 95% 치사량 수준에서 최고 1,109배의 저항성 발달을 보여주고 있다. 현재 우리나라에서 가장 많이 사용하고 있는 왕스, 마브릭, 만패, 아피스탄 등도 모두 합성 플루바리네이트를 원제로 하고 있으나, 그 방제 효과가 떨어지는 문제점이 있다. 이는 이들 약제를 연속적으로 사용함으로써 꿀벌응애에 내성을 갖게 하였음이 그 원인이다. 이미 대다수 양봉가들이 현재 사용하고 있는 약제의 약효에 대해 의문점을 가지고 있는데, 그 이유는 이미 오랫동안 사용해온 탓에 유럽의 경우처럼 저항성이 상당한 수준에 달했기 때문으로 볼 수 있다.

꿀벌응애류 친환경 방제를 위한 약제 개발을 위하여 진피와 리모넨을 주성분으로 한 훈연제를 개발하여 꿀벌응애류 방제 효과 시험을 실시하였다. 진피리모넨 훈연제는 약해가 발생하는 것으로 확인되었다. 또한 대조구로써 폴벡스를 처리한 군의 경우 꿀벌응애에 대한 효과는 지속적으로 발생하였으나 중국가시응애에 대한 약효는 유의적으로 관찰 되지 못하였으며, 폴벡스는 농약성분의 잔류성이 높아 금지 약품으로 분류 되어 있어 농가에서 사용 할 수 없는 약제이다.

따라서, 본 연구에서는 기존 약제들이 가지고 있는 독성 및 내성으로 인한 피해를 예방할 수 있는 꿀벌응애류 방제용 친환경 약제의 개발에 대한 연구를 수행하였다.

1. 꿀벌응애 방제용 친환경 약제의 개발: 재료 및 방법

가. 꿀벌 시료

국립농업과학원 잠사양봉소재과 꿀벌육종연구실 실험양봉장에서 사육 중인 서양종 꿀벌 봉군을 이용하여 약제 방제 효과 시험을 수행하였다.

나. 꿀벌용에큐 방제 친환경 약제

꿀벌용에큐 방제용 친환경 약제로써 FGMO, Limonene, 진피를 이용하였으며, 혼연제 및 혼중제를 제조하여 시험에 사용하였으며, 대조 약제로 풀루바리네이트 계열 약제와 cinamon oil을 사용하였다.

2. 꿀벌용에큐 방제용 친환경 약제의 개발: 결과 및 고찰

가. 꿀벌용에큐 방제용 친환경 약제 살충력 시험

리모넨을 50%농도로 봉군에 처리한 시험 결과, positive control인 풀루바리네이트(왕스) 약제를 사용한 것과 비교하였을 때, 방제효과가 떨어지는 것으로 확인 되었다(그림 4-1).

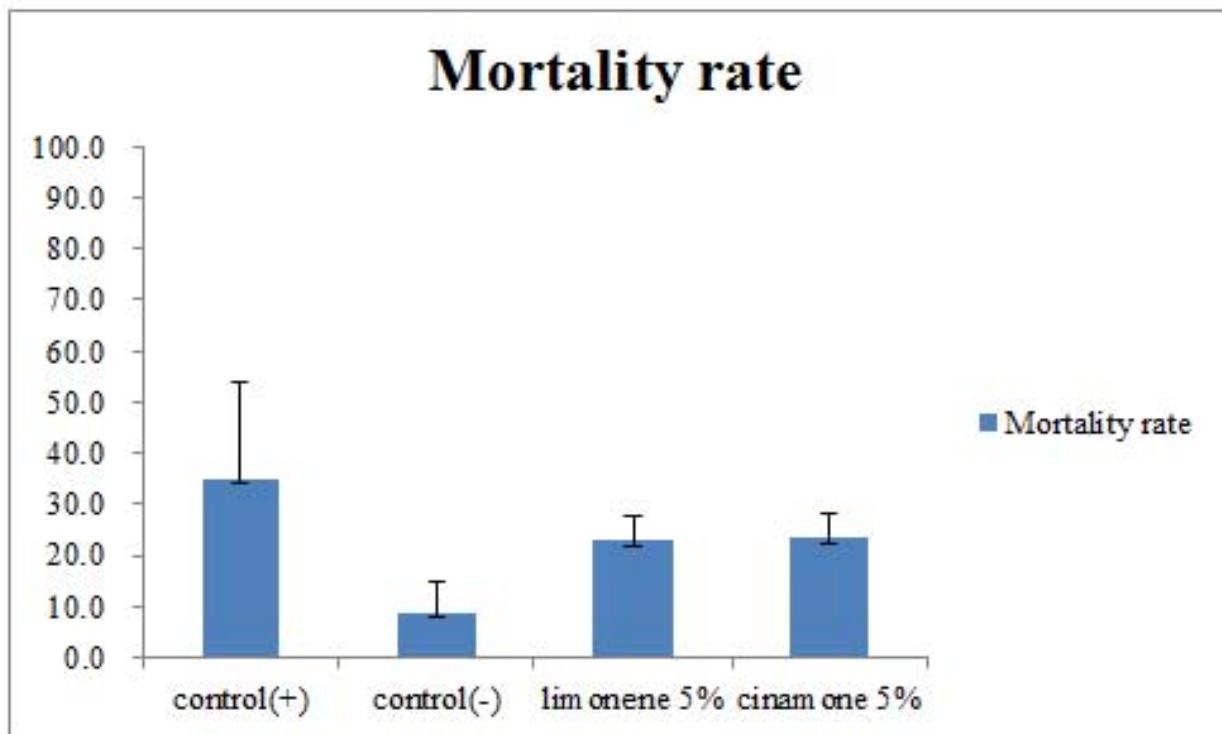


그림 4-1. Limonene와 cinamone oil의 꿀벌용에큐 방제 효과 시험

그림 4-1의 결과에 따라서 리모넨을 1, 3, 5, 10%농도로 봉군에 처리한 시험을 수행하였다. 그 결과, positive control인 풀루바리네이트(왕스) 약제를 사용한 것과 비교하였을 때, 1, 3, 5%의 농도는 방제효과가 떨어지는 것으로 확인 되었으나, 10% 리모넨의 경우 약 7일이 경과 한 후에는 꿀벌용에큐 방제 효과가 기존에 가장 많이 사용하고 있는 약제인 풀루바리네이트 계열 약제와 유사한 방제 효과를 보였다(그림 4-2).

이는 리모넨을 이용한 친환경적인 방법의 꿀벌용에큐 방제가 가능할 것을 시사한다.

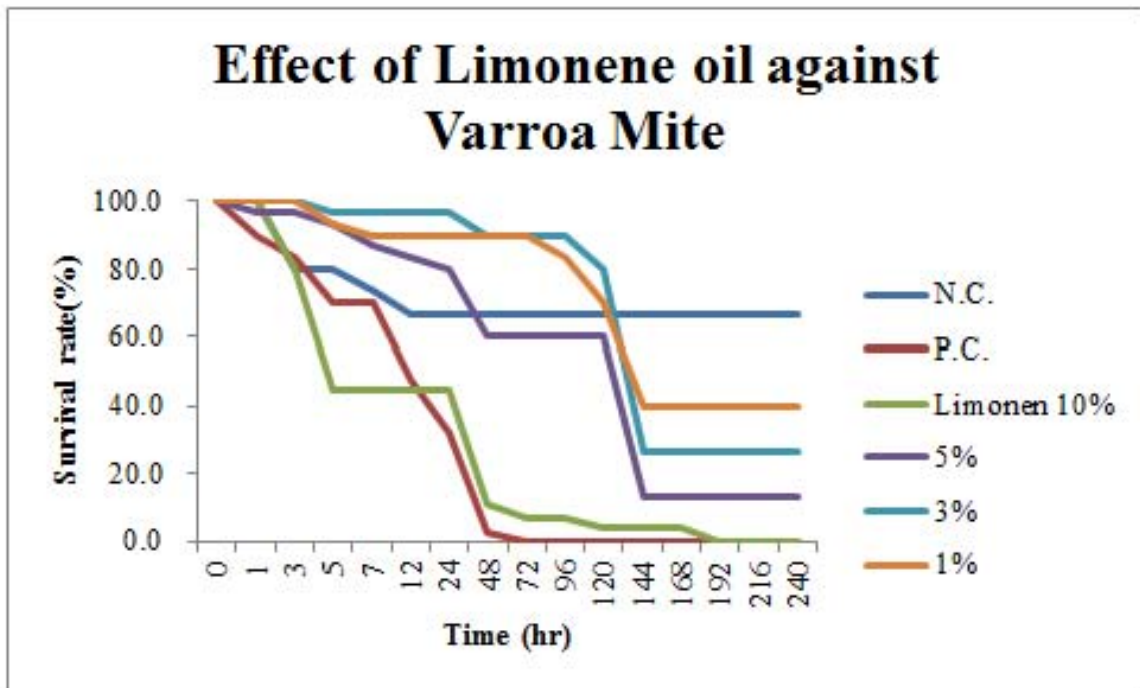


그림 4-2. Limonene oil의 꿀벌용애벌레 방제 효과

아울러 이미 꿀벌용애벌레에 대한 방제 효과가 보고되어 있는 cinamone oil의 꿀벌용애벌레 방제 효과 시험 결과 풀무바리테이트 계열 약제와 cinamone 5%, 10%가 가장 살충효과가 뛰어난 것으로 확인 되었다. 특히적으로 3%의 농도에서도 일주일간 처리 시 살충효과가 우수한 것으로 확인 되었다(그림 4-3).

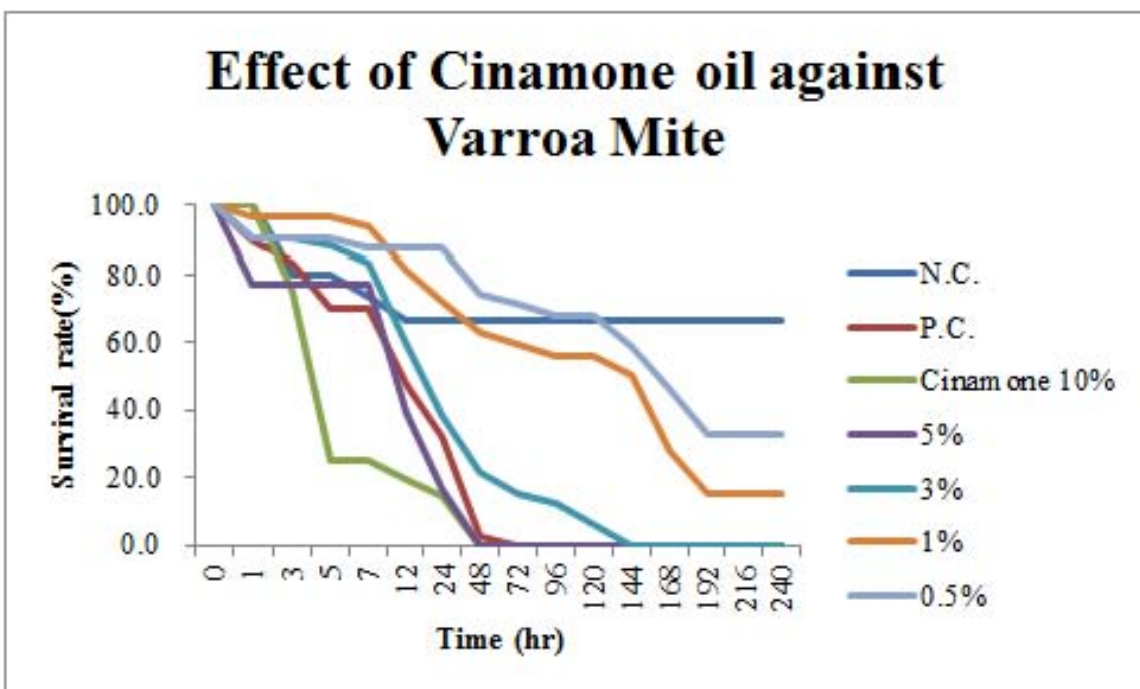


그림 4-3. Cinamone oil의 꿀벌용애벌레 방제 효과

나. 꿀벌용애와 중국가시용애의 봉군 내 상호작용

(1) 꿀벌용애의 봉군 내 생활사

꿀벌용애는 한 마리의 꿀벌용애가 일벌방에 들어가면 12일 경과 후 세 마리의 교미된 성충이 출방을 하고 수벌방에 들어가게 되면 15일 후 7마리의 교미된 성충이 출방을 하게 된다.

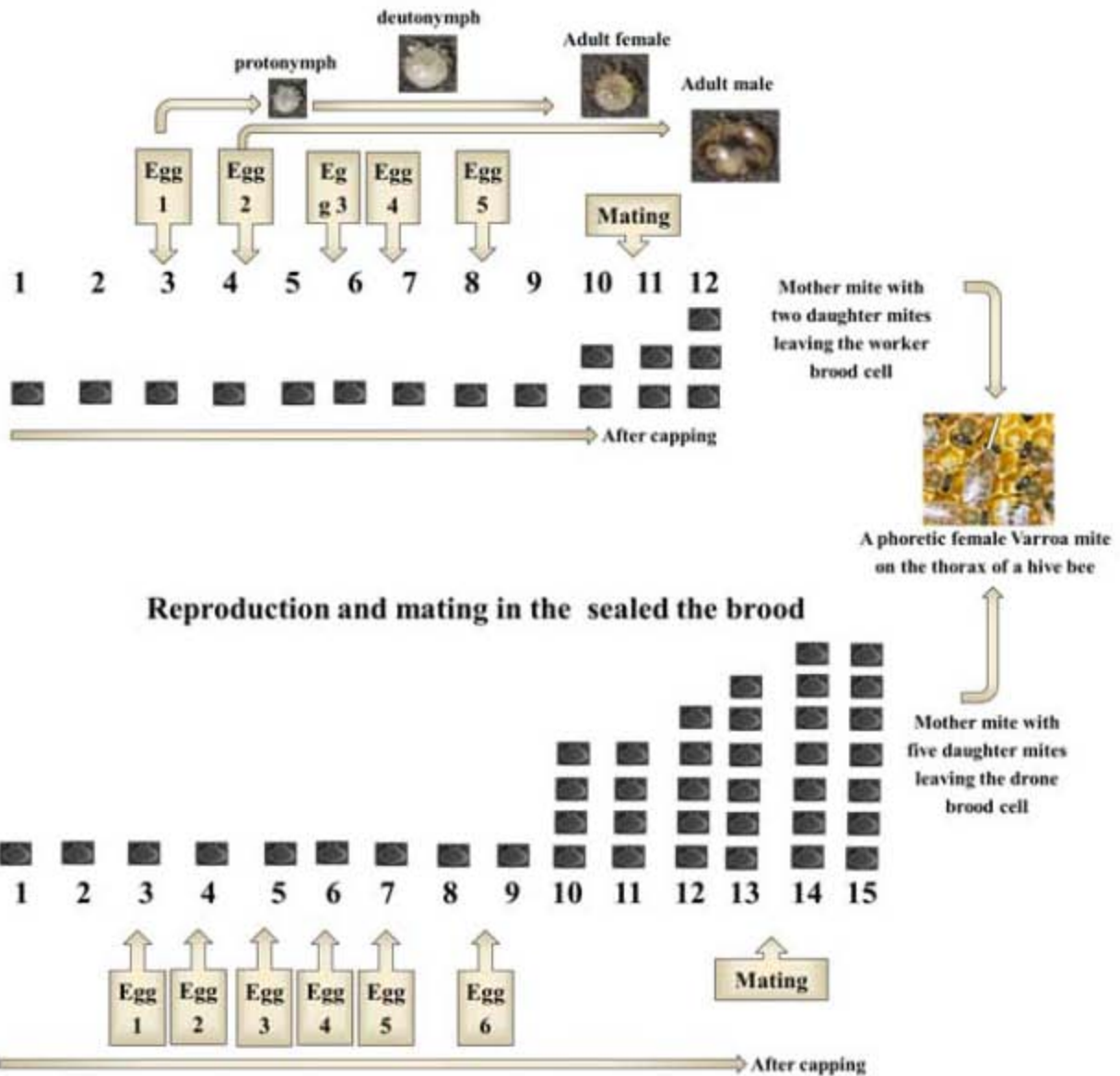
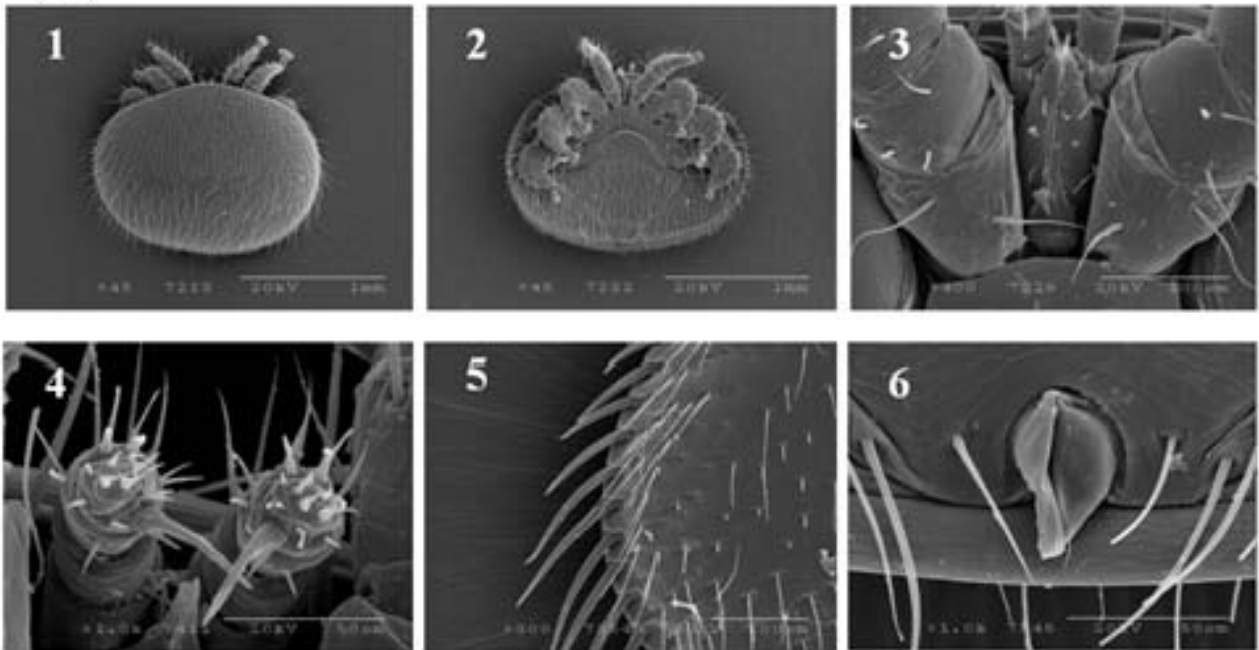


그림 4-4. 꿀벌용애와 중국가시용애의 생활사.

(2) 꿀벌용애 및 중국가시용애 외형적 특성

꿀벌용애는 흡즙기관이 기주의 체표를 찢어서 기생할 수 있으며, 외형의 곡선상 성충에 장기간 부착이 가능한 형태를 보이고, 중국가시용애는 구기가 뜯는 형으로 되어 있으며, 외형적 특성으로 인하여 성충에 장기간 부착이 불가능한 형태로서 유충에 특이적으로 피해를 일으킬 수 있다.

(A)



(B)

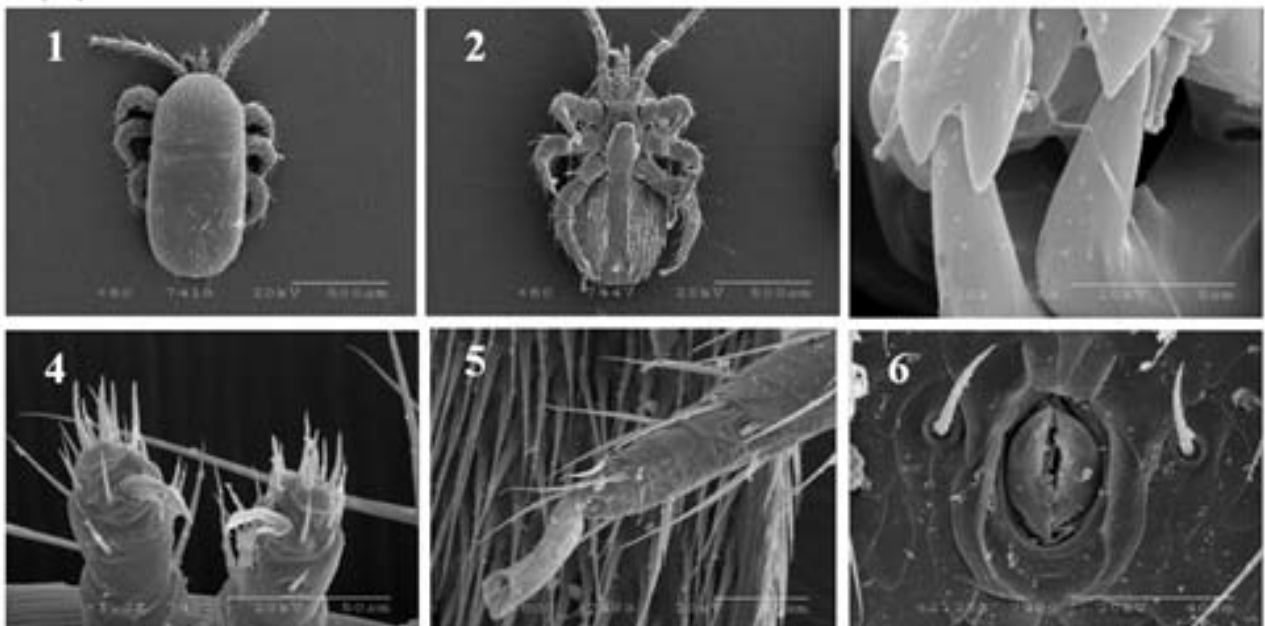


그림 4-5. 꿀벌용애와 중국가시용애의 외형적 특징. A : 꿀벌용애, B : 중국가시용애.

(3) 꿀벌용애류의 봉군 내 상호작용

용애류가 봉군 내에서 가장 활발하게 증식하는 시기에 봉군 내에서 꿀벌용애류의 상호작용을 봉군 내 꿀벌용애와 중국가시용애는 봉군 내에서 동일 먹이원(유충)을 가지고 있는 경쟁적 관계로 개체 증식이 되는 것으로 확인되었다. 따라서 어느 한 종이 관찰되지 않는다고 해서 다른 종이 없는 것이 아니며, 중국가시용애의 경우와 같이 육안으로 관찰하기 힘이 드는 종의 경우에는 꿀벌용애 개체수 검사를 해서 적절한 약제를 이용한 방제가 필요하다.

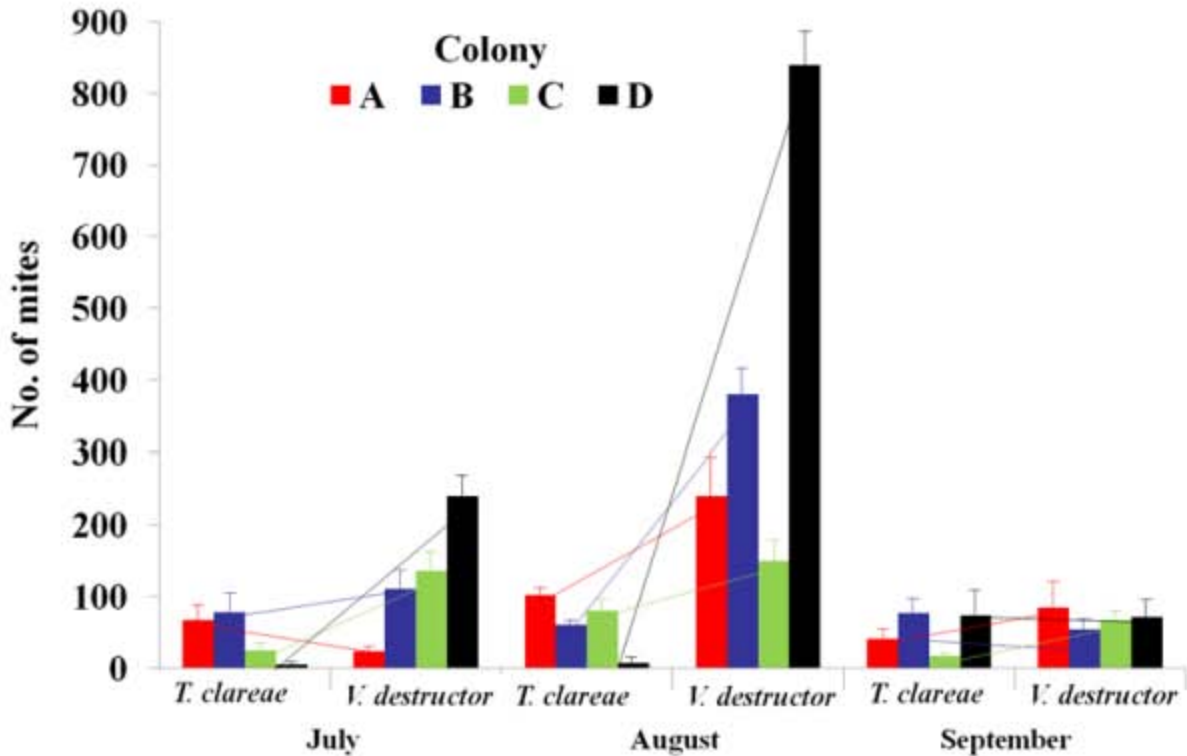


그림 4-6. 꿀벌용애와 중국가시용애의 봉군 내 상호작용 구명

(4) 꿀벌용애류 피해에 따른 꿀벌의 면역 체계반응

꿀벌용애류의 피해에 따른 꿀벌 면역 관련 유전자 발현 양상을 관찰하여 꿀벌용애 발생시 고단백의 먹이 공급을 통한 꿀벌 폐사 등의 피해를 줄이기 위한 기반을 마련하기 위하여 꿀벌용애류의 가해에 따른 꿀벌이 분비하는 면역관련 물질을 조사하였다.

벌통에서 꿀벌용애가 몸에 붙어서 흡즙을 하고 있는 일벌과 수벌을 채집하여 각각 RNA를 분리 후 cDNA를 합성하여 PCR을 하였다. 각각의 유전자증폭을 위하여 특이적 프라이머를 사용하였는데, 꿀벌이 분비하는 대표적인 면역 및 항균물질인 Abaecin, Hymenoptaecin, Defensin,

Royallisin을 증폭시키는 primer를 사용하였다. 이 경우 수벌과 일벌 중 꿀벌응애 피해를 받은 개체가 면역 관련 유전자 발현이 많은 것으로 확인 하였다(그림 4-7; 그림 4-8).

그러나 Hymenoptaecin의 경우에는 오히려 발현량이 감염시 줄어드는 것으로 확인되어 꿀벌응애가 꿀벌의 면역체계(생체방어 시스템)를 교란하여 질병에 쉽게 걸리는 역할을 하는 것으로 확인 하였다.

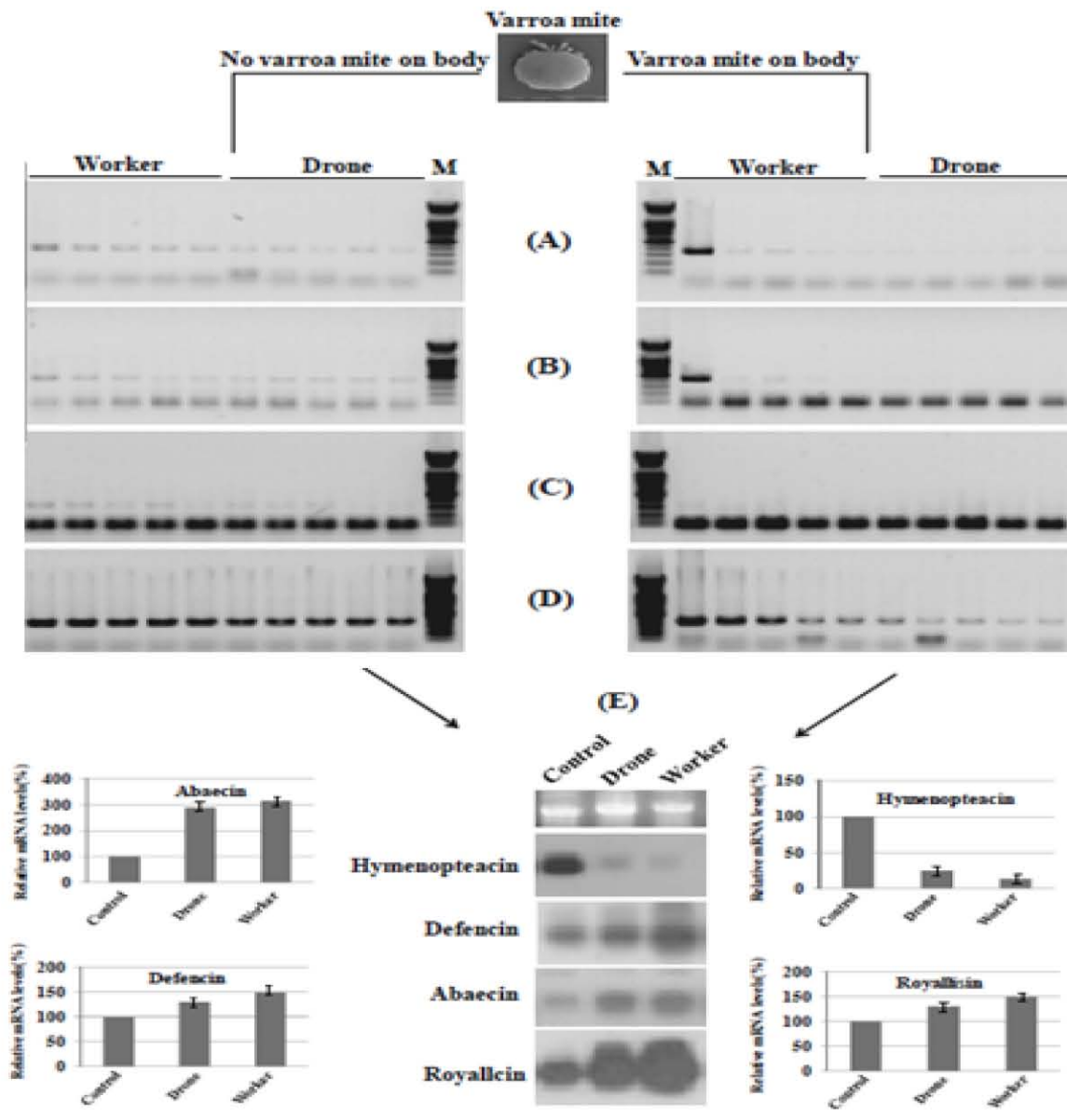


그림 4-7. 꿀벌 응애 피해 유무에 따른 면역관련 유전자들의 발현 양상
 꿀벌응애 기생에 따른 꿀벌 면역관련 유전자 (A), Hymenoptaecin (B), Defencin (C), Royallisin (D)의 발현정도를 측정

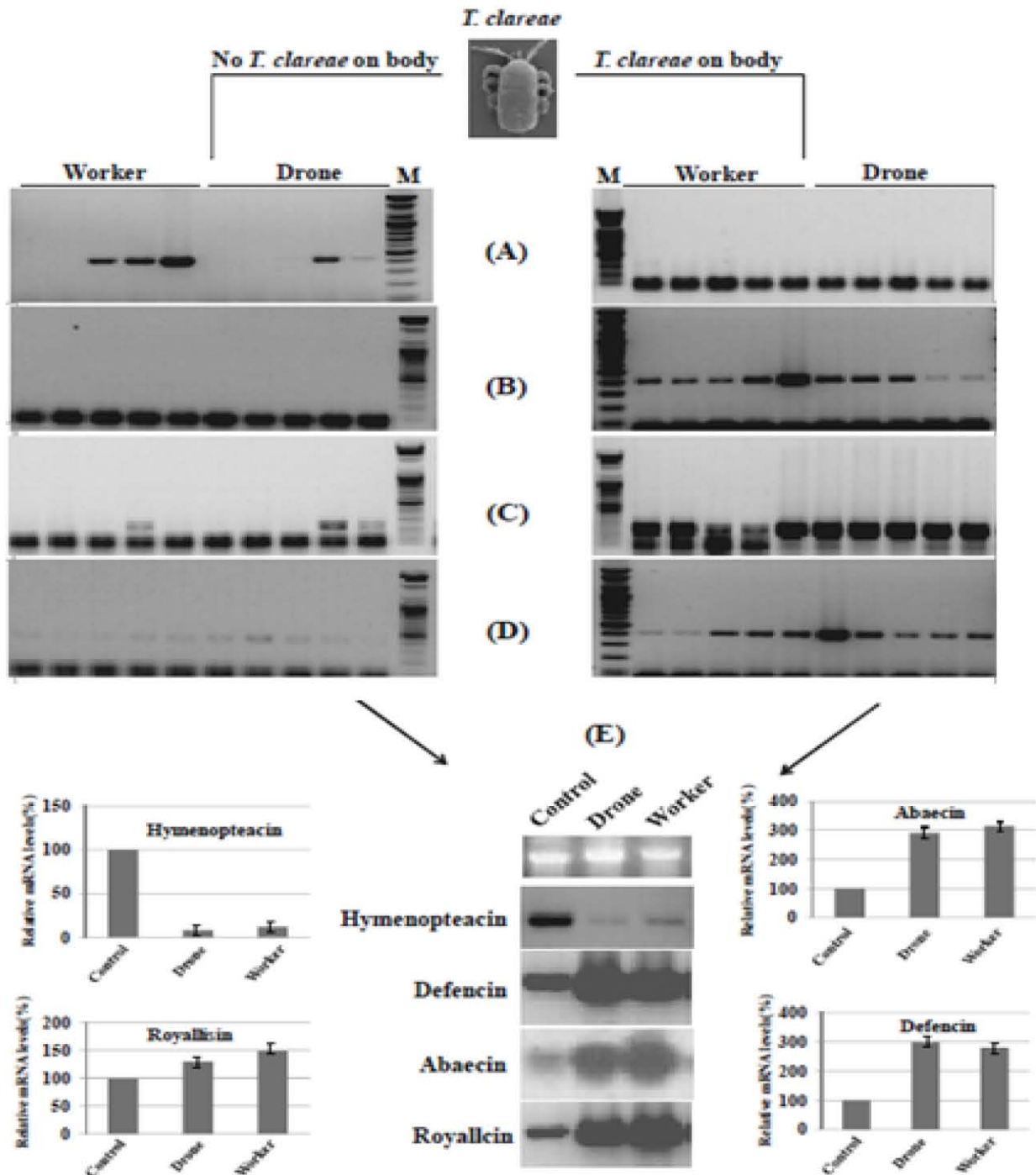


그림 4-8. 중국가시응에 피해 유무에 따른 면역관련 유전자 발현 양상
 중국가시응에의 기생에 따른 꿀벌 면역관련 유전자 (A), Hymenoptecin (B), Defencin (C),
 Royallisin (D)의 발현정도를 측정

제 5 절 꿀벌해충의 방제를 위한 친환경 약제의 개발

본 과제는 꿀벌에게 기생하여 병원체를 매개하는 것으로 알려진 꿀벌해충의 생활적 특성을 연구하고 이에 따른 방제 약제의 사용효과를 검정하고자 하였으며, 이들에 의한 바이러스 매개여부를 조사하였다.

꿀벌부채명나방(Wax moth)의 경우, 토종벌(*Apis cerana*)에 질병(바이러스병)의 매개를 비롯한 봉군 폐사에 악영향을 미친다. 이 해충의 기생특성을 조사하고 이에 의한 토종벌 낭충봉아부패병 매개여부를 검정하였으며, 미국부저병 등 기타 질병의 매개여부를 확인하였다.

꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)을 방제하기 위한 미생물 살충제의 개발을 위하여 Bt균주를 선발하고 각각의 균주가 가지고 있는 유전적 특성을 구명하고 독성단백질을 분리하였으며, 균주들의 유전적 특성을 구명하여 나방류 해충인 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)에 대한 살충력을 검정하였다.

그 결과 선발된 *B. thuringiensis* K1과 K2는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 1령기와 5령기에 우수한 살충력을 보이는 것을 확인하였다. 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충의 반수치 사농도(LC₅₀)를 측정된 결과 *B. thuringiensis* K1은 24.08 μ g/ml, *B. thuringiensis* K2는 32.83 μ g/ml임을 확인하였는데, 특이한 점으로 K1은 5령기 유충, K2는 1령기 유충에 보다 우수한 살충효과를 보였다.

이러한 결과를 바탕으로, 선발된 균주는 각각 배양하여 혼합사용 하는 것이 넓은 발생단계의 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충을 효과적으로 살충할 수 있을 것으로 보인다.

또한 토종벌에는 알려져 있지 않은 기타 해충의 특성을 조사하고 이에 의한 질병의 매개 여부를 조사하여 토종벌 낭충봉아부패병 예방을 위한 해충 방제의 중요성을 검정하였다.

1. 꿀벌부채명나방 방제 시험

가. 재료 및 방법

(1) 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.) 사육

토종벌(*Apis cerana*) 봉군 내에 기생하면서 피해를 유발하는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)은 국내 양봉장에서 사육중인 벌통에서 채집하였으며, 이 등(2007)의 방법에 의하여 30℃에서 24시간 암조건으로, 벌집을 절단하여 먹이로 주며 실내에서 사육하면서 과 같은 생활사에서 각각의 령기별로 선별된 유충을 살충력 검정에 사용하였다(그림 5-1).

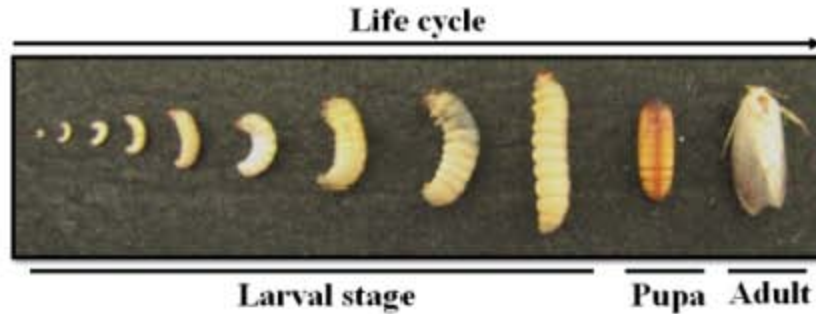


그림 5-1. Life cycle of wax moth, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyraloidea).

(2) *Bacillus thuringiensis* 균주 분리

양봉장 인근 포토로부터 2-5cm 깊이에서 수집된 토양과 꿀벌 벌통 내의 벌집에서 *Bacillus thuringiensis* (Bt)를 분리하기 위한 기본 배지는 nutrient agar (NA, Difco, BactoR) 배지를 이용하였다.

분리방법은 시료 1g씩을 임의로 취하여 이를 9ml의 멸균수가 들어있는 시험관에 넣고 10분간 교반한 후 기타 미생물의 성장을 억제하기 위하여 80℃에서 10분간 열처리하고 희석평판배양법으로 희석한 후 NA agar plate에 도말하였다.

그리고 30℃ 항온기에서 4~5일간 배양함으로써 형성된 colony를 위상차 현미경 (×1000)으로 관찰하여 포자와 내독소 단백질을 형성하는 균주를 선별하였으며(그림 5-2), 선별된 Bt 균주는 단일 클로니로 순수 분리하였으며 임의로 *B. thuringiensis* K2로 명명하였다.

(3) *Bacillus thuringiensis* 균주 살충력 검정

꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 방제를 위한 *Bacillus thuringiensis* 균주는 서울대학교에서 분양받은 *B. thuringiensis* K1과 벌봉 양봉장 인근 토양에서 분리한 *B. thuringiensis* K2를 시험에 사용하였다. *B. thuringiensis* K1과 K2 균주는 살충력 검정을 위하여 GYS배지 [(NH₄)₂SO₄ ; 0.2%, K₂HPO₄ ; 0.05%, CaCl₂ ; 0.008%, MgSO₄ ; 0.002%, MnSO₄ · 4H₂O ; 0.005%, Yeast extract ; 0.2%, Glucose ; 0.1%]에 5일간 배양하였다.

배양되어 완전한 auto-lysis가 이루어진 배양액을 원심분리한 후 특성단백질만을 회수하여 살충력 검정에 이용하였으며 살충력 검정은 3반복으로 수행하였다. 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)을 링기벌로 유충 10마리씩 선별하여 1일간 섭식을 중단시키고 앞서 회수한 내독소단백질을 희석하여 살포한 공소비를 섭식시키는 방법으로 살충력을 검정하였다. 살충력 검정시에 Bt 농도를 1μg/ml ~ 100μg/ml 단계별로 설정하였으며 4×6cm의 공소비에 1ml의 내독소단백질을 살포하여 사용하였다.

(4) *Bacillus thuringiensis* 균주의 Plasmid DNA 분리

Bacillus thuringiensis 균주의 Plasmid DNA 분리를 위해 5ml LB 배지에 접종하고, 30°C에서 12시간 동안 배양하였다.

배양액을 100ml SPY 배지[(NH₄)₂SO₄ ; 0.2%, K₂HPO₄ ; 1.4%, KH₂PO₄ ; 0.6%, Sodium citrate ; 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O ; 0.02%, Yeast extract ; 0.1%, Glucose ; 0.1%]에 다시 접종한 다음, 30°C에서 OD₆₀₀=0.7될 때까지 배양하였다. 이것을 Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다.

(5) 내독소 단백질 유전자형 조사를 위한 PCR

PCR을 통해 *Bacillus thuringiensis* 균주가 가지는 내독소 단백질 유전자에 대한 유전자형을 조사하기 위해 현재까지 보고된 *cry* 유전자내의 보존영역을 특이적으로 증폭시키는 특이적인 PCR primer를 사용하였다.

PCR은 Pre-Mix (Bioneer, Korea)에 *B. thuringiensis* plasmid DNA 시료와 각 primer 0.1~0.5 μM을 넣은 다음 DNA Thermal Cycler (Bioneer, Korea)로 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분씩 35회 반복조건을 설정하여 수행하였으며 그 primer의 염기서열은 Table 5-1에 나타내었다(Kalman et al., 1993; Chang et al. 1998).

(6) 배지선발 및 대량배양

*Bacillus thuringiensis*의 대량배양 배지로는 대두박(soybean cake)과 밀기울(wheat bran)을 이용하였다. 대량배양용 배지선발을 위해 대두박(S)과 밀기울(W)을 조합한 11가지 조건(SW 비율은 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10)의 배지와 GYS 배지의 Colony Forming Unit (CFU)을 비교하였다.

초기 12시간은 2시간 간격으로, 그 후에는 24시간 간격으로 총 5일간 sampling을 하여 희석평판배양법으로 NA agar plate에 10단계 농도별로 희석한 sample을 도말하여 배양한 후 CFU를 조사하였다. 그 중 control인 GYS 배지와 비교하여 배양조건이 좋은 비율의 배지를 선발하여 대량배양에 사용하였으며, 이 때 선발된 배지는 대두박과 밀기울의 비율이 3:7인 SW 3:7 배지의 CFU가 GYS와 비교했을 때 뿐만 아니라 다른 조건의 배지들 보다 월등히 높았기 때문에 이 조건으로 5L 배양기에 3L 용량의 배지를 제조하여 균의 대량배양에 사용하였다.

표 5-1. Profile of *cry* gene specific primers.

<i>cry</i> gene type	primer	PCR product size (bp)
<i>cry1Aa</i>	5' GAGCCAAGCGACTGGAGCAGTTTACACC	782
<i>cry1Ab</i>	5' TCGAATTGAATTTGTTCC	238
<i>cry1Ac</i>	5' TCACTTCCCATCGACATCTACC	487
<i>cry1B</i>	5' GTCCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	902
<i>cry1C</i>	5' CAACCCTATTTGGTGCAGGTTC	288
<i>cry1D</i>	5' GGTACATTTAGATGTTACAGCCAC	465
<i>cry1E</i>	5' CTTAGGGATAAATGTAAGTACAG	961
<i>cry1F</i>	5' CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	383
<i>cry13'</i>	5' ATCACTGAGTCGCTTCGCATCTTTGACTTTCTC	-
<i>cry1G5'</i>	5' ATATGGAGTGAATAGGGGG	235
<i>cry1G3'</i>	5' TGAACGGCGATTACATGC	
<i>cry25'</i>		
<i>cry23'</i>	5' CAGATACCCTTGCTGGTGTA	1073
<i>cry3AB</i>	5' ATAGGCCCGTGCTCCACCAGG	
<i>D5'</i>	5' CCGAACAATCGAAGTGAA	-
<i>cry3A3'</i>	5' ATAGATGGTCCTACT	1964
<i>cry3B3'</i>	5' ATTGTTGAACGGCAACAA	1359
<i>cry3D3'</i>	5' ATTGTTGACGGCAACAA	1135
<i>cry3C5'</i>	5' CCTGAAAATTGCAGGCC	1074
<i>cry3uni3'</i>	5' AATTGATCAATAGAATC	
<i>cry4A5'</i>	5' CGAGGTGAATTTGCTCC	1032
<i>cry4A3'</i>	5' ATGGCTTGTTTCGCTACATC	
<i>cry4B5'</i>	5' GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	2610
<i>cry4B3'</i>	5' TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4B5'</i>	5' GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	1393
<i>cry4B3'</i>	5' TGACCAGGTCCCTTGATTAC	
<i>cry4C5'</i>	5' ATGAATCCATATCAAAATAAG	2040
<i>cry4C3'</i>	5' AAGAACTTTGTTTAAATTAAC	
<i>cry4D5'</i>	5' ATGGAGATAGTTCTTTAGAT	1932
<i>cry4D3'</i>	5' CTACTTTAGTAACGGATT	
<i>cry55'</i>	5' ATGAAACTAAAGAATCAA	2174
<i>cry53'</i>	5' GGTAGATTTTAAATTCTAC	

나. 결과 및 고찰

(1) 토종벌 기생 및 출입 해충 조사

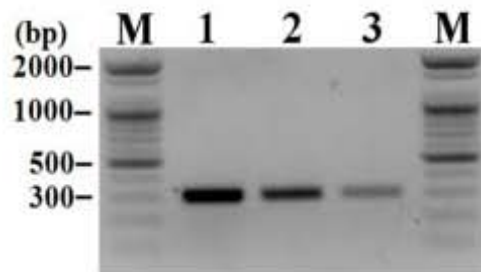
토종벌 봉군을 출입하는 수중다리좀벌은 꿀벌부체명나방의 천적으로 알려져 있으나, 이에 의한 미국부저병 전염 가능성을 PCR진단법으로 확인하였으며, 염기서열 확인 결과 미국부저병균 (*Paenibacillus larvae*)의 metalloprotease partial 유전자인 것으로 확인되었다. 따라서 토종벌 봉군에 출입하는 거의 모든 곤충류는 토종벌 낭충봉이부패병을 비롯한 각종 질병을 매개하는 매개체 역할을 하고 있으며, 이의 방제는 토종벌 봉군 폐사를 줄이는 효과적인 방법이 될 것으로 보인다(그림 5-2).



(A)



(B)



(C)

```

1      10      20      30      40      50      60
1  GCAGCAATCGTATTCAGAGAGCGTGAAGGAAACCTTATCCCTTCGCGGAGACCT
1  Q Q I V F R D G D D K T F I P F R D S
61  GGATCTGGTAGGCGATGAATTGACTACGGACTTACGACATACGGCCAAATTTGGAGTA
21  D V V G H E L T R G V T E H T A N L E Y
121  TGAGACGAATCGGAGCATTGAATGATCGATTGGATATATCGGCAATCGGATGAA
41  E N E S G A L N E S I S D I I G N A I S
181  AGGCAAGGATGGCTTATTTGGGAGACCTGTATACCCCGAATTCGAGAGATGCTC
64  U R U W L I L R G V T T F R L P R U A
    
```

(D)

그림 5-2. 꿀벌 사체 기생파리

(A) 외부형태, (B) 수중다리 좀벌, 좌 : 암, 우 : 수, (C) 수중다리좀벌의 미국부저병 감염: Lane 1 : 일벌 미국부저병진단, Lane 2 : 수벌 미국부저병진단, Lane 3 : 수중다리좀벌 미국부저병진단. (D) 미국부저병균 *Paenibacillus larvae* metalloprotease 유전자 염기서열.

(2) 꿀벌부채명나방 방제 균주 선발

(가) 꿀벌부채명나방 피해

꿀벌부채명나방은 봉군 내에서 증식 및 생활을 하는 해충으로써 그림5-3과 같이 일벌에 피해를 주어서 일벌방이 붕괴 되지 않는 것을 관찰하게 되면 꿀벌부채명나방에 대한 피해라고 볼 수 있다.

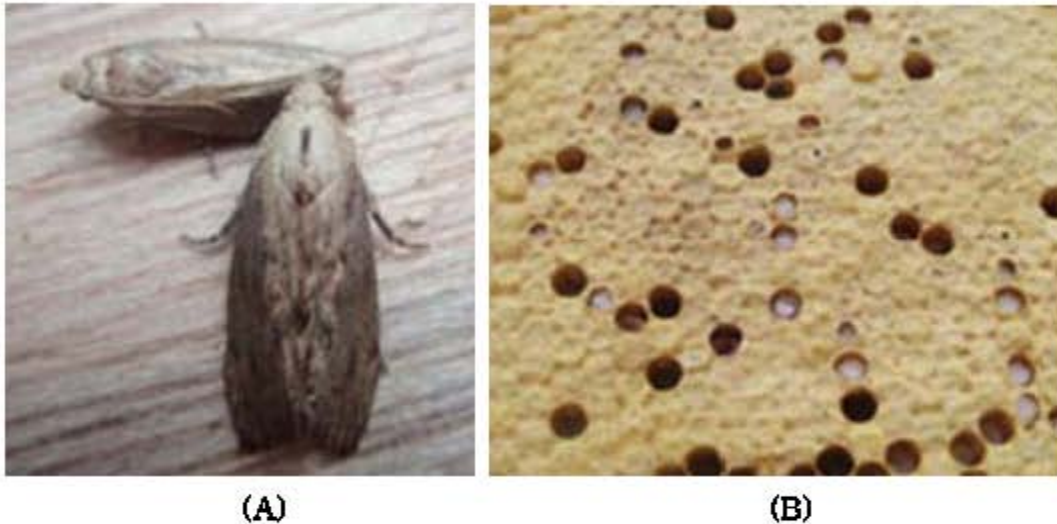


그림 5-3. 꿀벌부채명나방(A)과 피해 봉판(B)

(나) 선발 강독성 Bt K1과 K2의 생화학적 특성구명

꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.) 방제를 위한 독성과 살충 범위에서 가장 효과적인 *Bacillus thuringiensis* K1과 K2의 특성을 조사하기 위하여 *B. thuringiensis* K1과 K2의 내독소 단백질의 형태를 위상차현미경으로 관찰하였다(그림 5-4).

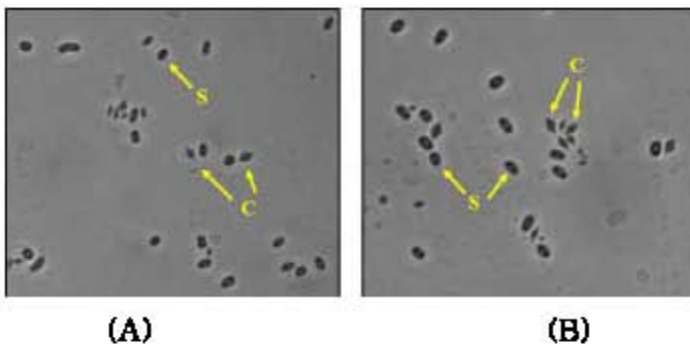


그림 5-4. *B. thuringiensis* K1 (A)과 *B. thuringiensis* K2 (B)의 내독소 단백질 및 spore.

B. thuringiensis K1과 K2는 각각 포자를 형성하고 crystal protein을 형성하여 기존에 알려져 있는 *B. thuringiensis* 균주의 특성인 포자형성 및 독성단백질을 발현하는 균주로 확인하였다 (그림 5-5).

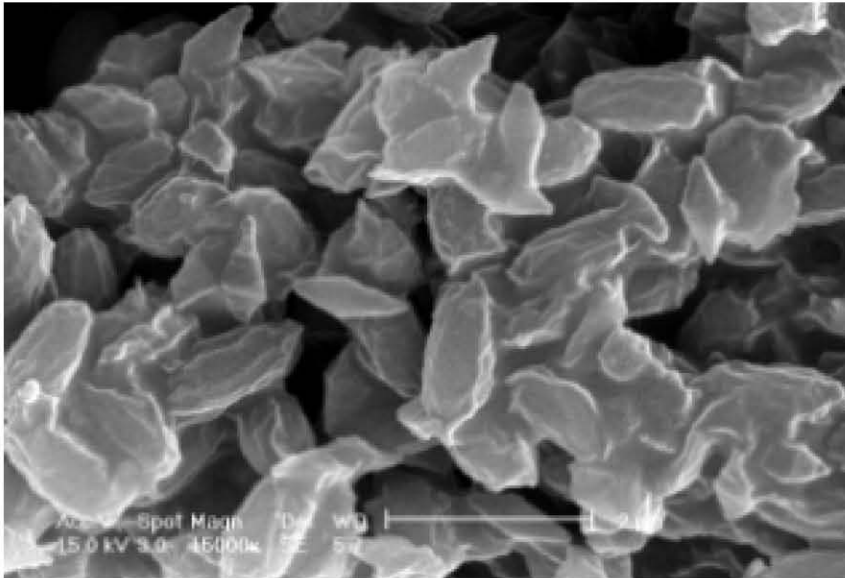
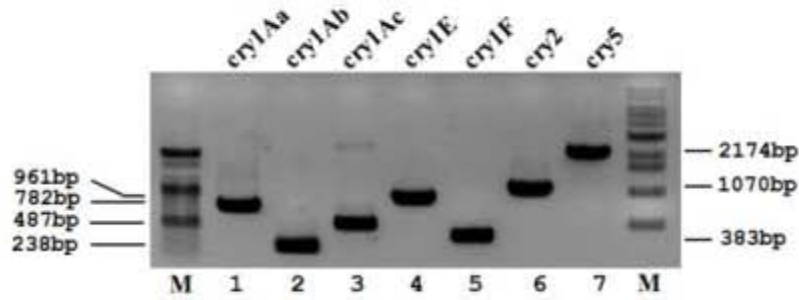


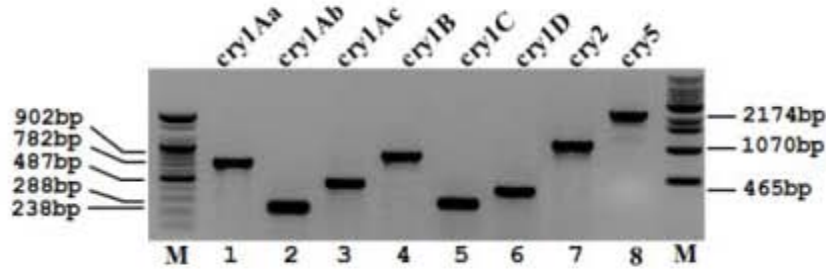
그림 5-5. *B. thuringiensis* K1 (A)과 *B. thuringiensis* K2 (B)의 내독소 단백질 전자현미경 사진

또한, *B. thuringiensis* K1과 K2 균주의 분리된 plasmid DNA를 주형으로 증폭된 PCR결과로 *B. thuringiensis* K1은 일반적으로 나방류에 독성을 가지고 있는(Herman and Whiteley, 1989) *B. thuringiensis* 균주가 보유하고 있는 *cry1*형의 단백질 유전자 영역의 발현을 확인하였으며, *B. thuringiensis* K1은 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1E* *cry1F*, *cry2* 그리고 *cry5*형의 단백질 유전자 영역의 발현이 확인되었다(그림 5-6A).

그리고 *B. thuringiensis* K2도 나방류에 살충력을 보이는 *cry1*형의 단백질 유전자 영역이 발현하는 것으로 확인하였는데, *B. thuringiensis* K1과는 상이하게 *cry1B*, *cry1C*와 *cry1D*가 발현되는 반면, *cry1E*와 *cry1F*는 발현이 되지 않는 것으로 확인되었다(그림 5-6B).



(A)



(B)

그림 5-6. *B. thuringiensis* K1과 K2의 내독소 단백질 발현 조사를 위한 PCR.

B. thuringiensis K1 (*cry1Ab*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1E*, *cry1F*, *cry2* and *cry5*) (A) 과 K2 (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry2* and *cry5*)의 PCR산물

(다) Bt K1과 K2의 살충력

Bacillus thuringiensis K1과 K2의 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella* L.) 유충을 50% 살충하는 농도(LC₅₀)를 측정된 결과 *B. thuringiensis* K1은 2408 μ g/ml에서 효과를 보였으며, 반수치사시간(LT₅₀)은 24시간이 소요되었다. 그리고 *B. thuringiensis* K2의 경우에는 반수치사농도(LC₅₀)가 32.83 μ g/ml을 처리하였을 때 효과를 보였으며, 반수치사시간(LT₅₀)은 36시간으로 확인되었다(표 5-2).


특이한 점으로 *B. thuringiensis* K1의 경우에는 동일량의 내독소단백질을 처리하였으나 3일이 경과한 후에도 50%이하의 살충력을 보여서 반수치사농도(LC₅₀)와 반수치사시간(LT₅₀)을 측정할 수 없었으며, 5령기의 유충에 대한 살충효과가 우수하게 관찰 되었으며, *B. thuringiensis* K2의 경우에는 2~5령기에서 K1과 유사하게 3일이 경과하여도 50%이하의 살충력을 보여서 반수치사농도(LC₅₀)와 반수치사시간(LT₅₀)을 측정 할 수 없었다(Data not show).

K2의 경우에는 1령기의 유충에 특이적으로 우수한 살충력을 보였다. 이는 선발된 *B. thuringiensis* K1과 K2균주별 분균에 적용할 경우 두 가지 균주별 혼합하여 사용한다면 폭넓은 유충령기에 대한 살충력을 보일 가능성이 있다.

따라서 본 연구에서는 국내에 보유종이거나 분리된 *B. thuringiensis* K1과 K2 두 가지 균주를

대상으로 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.) 유충에 대한 살충력을 검증한 결과, 토종벌(*A. cerana*)과 서양종 꿀벌(*A. mellifera*)에 직접적인 피해를 주는 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)을 적절히 제거할 수 있을 것으로 확인하였으며, 이러한 독성단백질을 벌통 내에서 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)이 먹을 수 있도록 소초광에 도포 및 혼합을 통한 소초광 제작 과정이 필요할 것으로 보인다.

표 5-2. *B. thuringiensis* K1 and K2의 꿀벌부채명나방에 대한 살충력

Species	<i>Galleria mellonella</i>		
	LC ₅₀ (µg/ml)	live dead	LT ₅₀ (hr)
<i>B. thuringiensis</i> K1	24.08≤		24
<i>B. thuringiensis</i> K2	32.83≤		36

특히 꿀벌부채명나방(*G. mellonella* L.)이 낭충봉아부패병 및 각종 질병을 매개하는 것으로 알려져 있는(Choi et al, 2012) 토종벌(*A. cerana*)에 이들 균주를 적용하였을 때, 보다 효과적으로 통균을 증식하고 질병발생 위험성을 낮출 수 있을 것으로 기대한다.

(3) 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 제제(B.t) 대량 배양 기술 개발

선발된 꿀벌부채명나방 방제용 미생물제제의 대량 배양을 위하여 저가형 탄소, 단백질원인 밀기울, 대두박을 이용한 저가배지 이용기술 개발 시험 결과, 대두박(S) 60%, 밀기울(W) 40% 비율의 배지 조성이 배양 후 5일이 경과한 후에도 가장 높은 spore를 형성하였으며, 이는 제제화 를 위한 대량배양용 배지 조성으로 선발되었다.

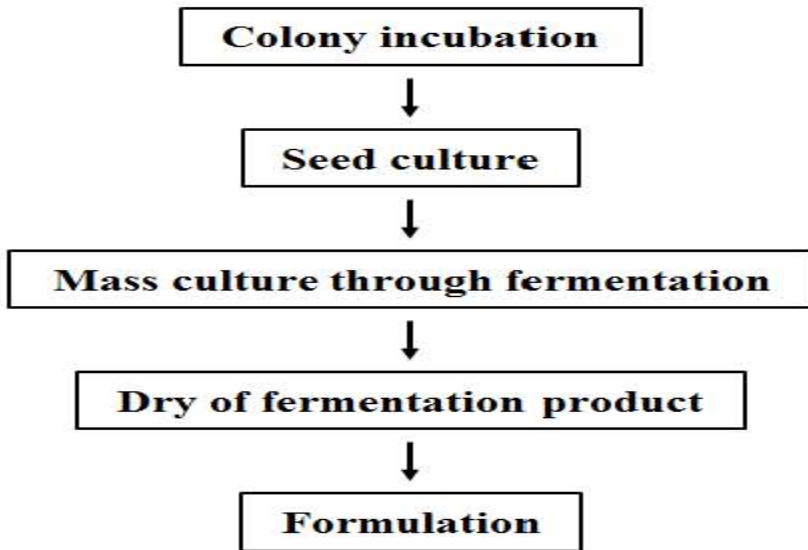


그림 5-7. 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 살충제(B.t)의 제제화 순서

대량배양은 그림 5-7과 같은 순서로 5일간 배양(표 5-3)하여 완전한 독소단백질 형성이 될 때까지 수행하였으며, 제제화를 위한 단계는 그림 5-8과 같이 검사를 실시하여 제제화하였다.

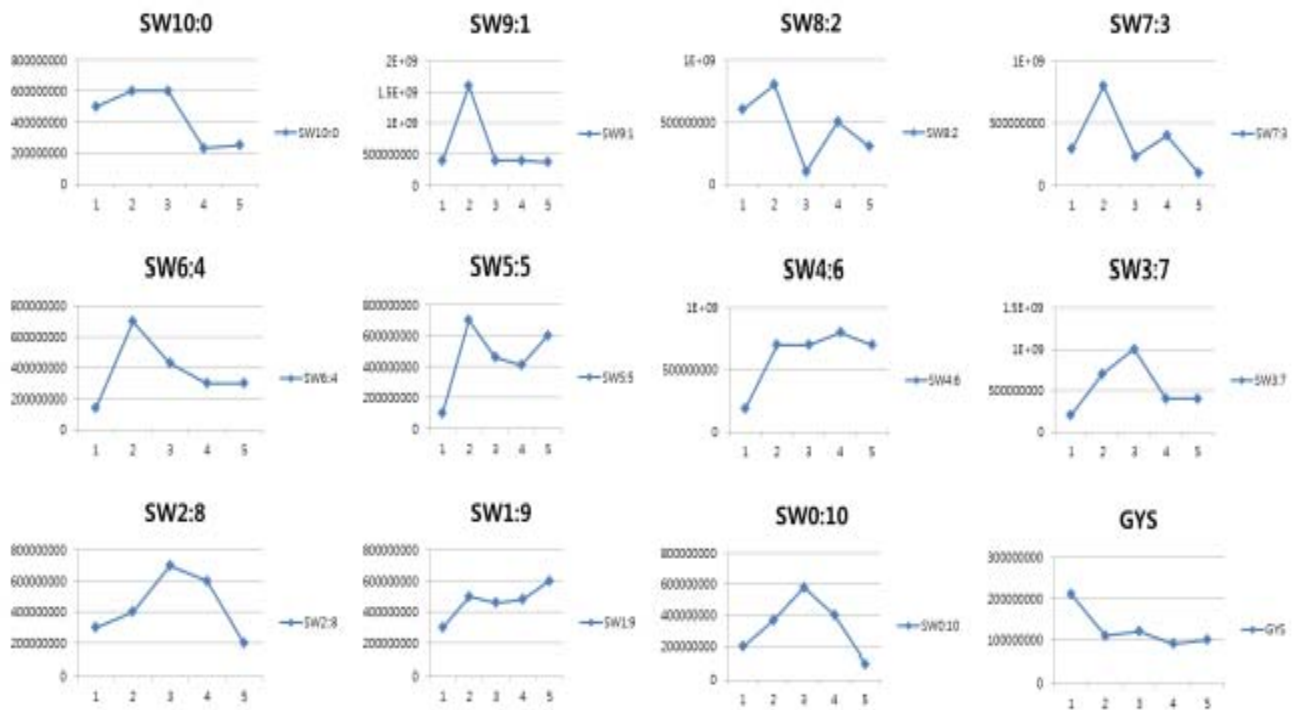
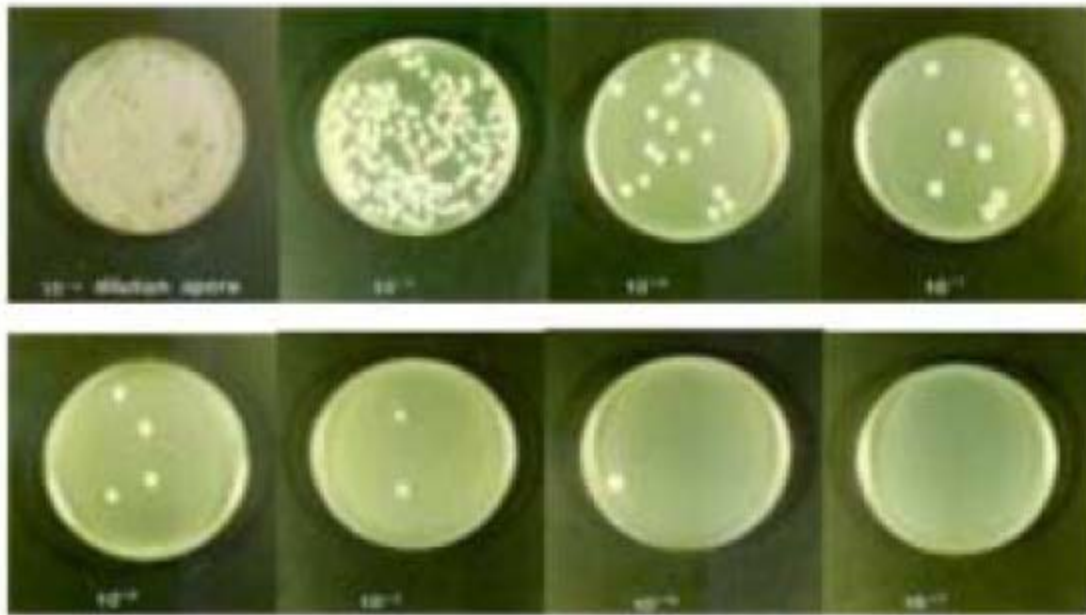


그림 5-8. 폐지 조성물 CFU측정

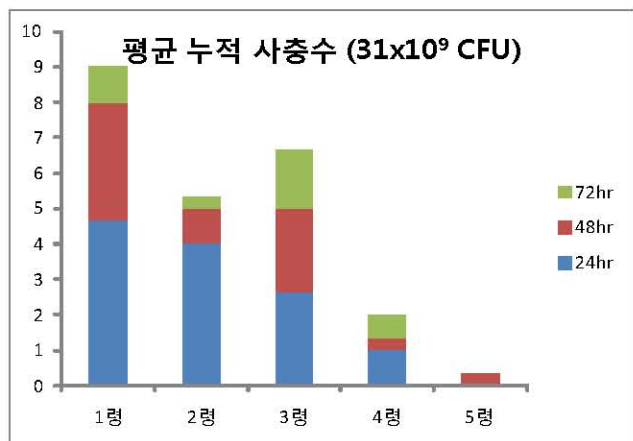
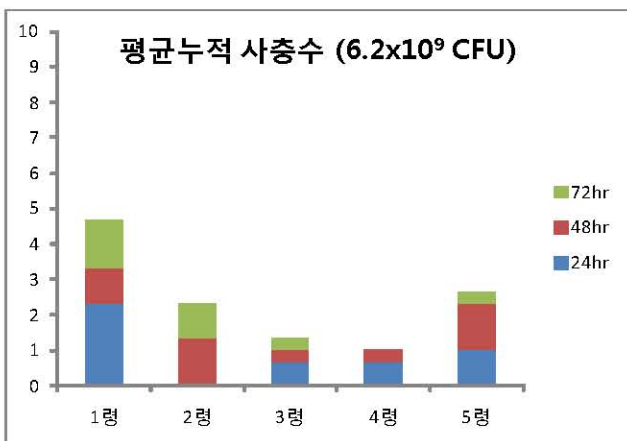
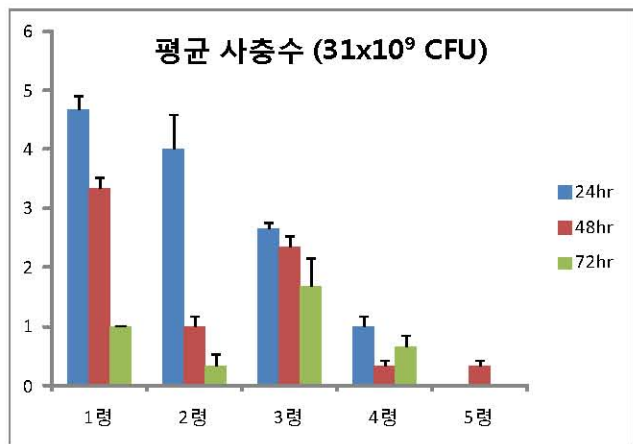
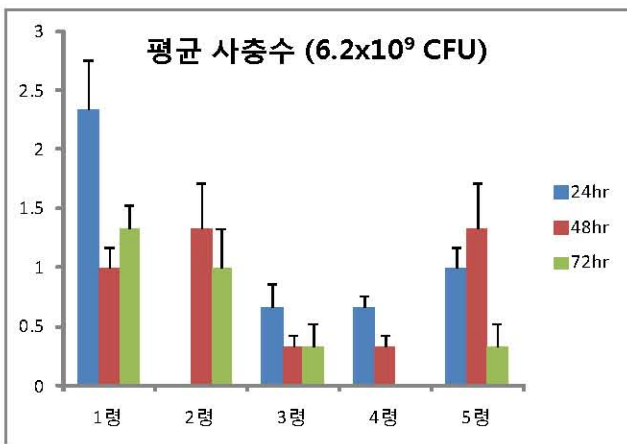
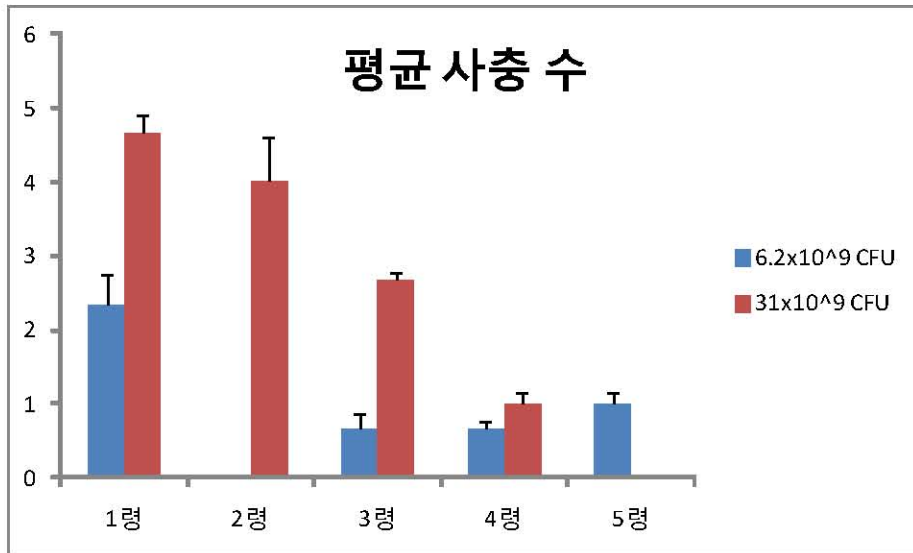
표 5-3. B.t 저가형 배지 대량배양 조건

Condition	5-liter
Volumes of medium	3-liter
Aeration	1vvm
No. of impellers	2
Agitation	100rpm
Incubation temperature	30℃
Starting pH	7.0
End of log-phase of growth	36 to 48h
End of sporulation phase	120h
Completion of lysis	5d
Age at harvest	5d
Usual spore count	9.6x10 ⁸ CFU/ml

(4) 대량 배양된 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 제제(B.t) 살충력 검정

동결건조한 *B. thuringiensis* K1의 대량배양 결과물은 내독소 단백질의 LC₅₀ 값에 비율을 맞추어 0.024 mg/ml으로 DW에 희석하여 처리하였으며, 대량배양 결과물에는 대두박과 밀기울 등의 부산물이 첨가되어 있으므로 내독소 단백질이 무게만큼 포함되지 않았을 거라 예상하여 임의로 5배의 농도 (0.12 mg/ml)로도 살충력 검정을 수행하였다. 이 때 CFU는 0.024 mg/ml에서는 6.2x10⁹ CFU, 5배농도인 0.12 mg/ml 에서는 31x10⁹ CFU로 계산되었다.

살충력은 각 령별로 10마리씩 총 5령까지 3반복 수행 하였으며, 24시간 간격으로 3일간 조사하였다. 살충력 검정에 사용된 먹이로는 4x6cm의 공소비를 사용하였으며, 대두박과 밀기울 부산물이 포함되어있기 때문에 평균 1ml의 희석한 약제를 공소비의 앞뒷면에 골고루 발라주었으며, 상온에 약 2시간 건조 후 실험에 사용하였다. 총 3일간 살충력을 검정한 결과 6.2x10⁹ CFU/ml 에서는 일 별로 9%, 18%, 24%의 살충력을 확인하였으며, 31x10⁹ CFU/ml 에서는 25%, 39%, 47%의 살충력을 확인하였다. 반수치사농도(LC₅₀)는 31x10⁹ CFU/ml로 계산되었으며 반수치사시간(LT₅₀)은 31x10⁹ CFU/ml의 농도일 때 26.5시간이 소요(1령기준)되었다(그림 5-9).



<뒷면 그림 계속>

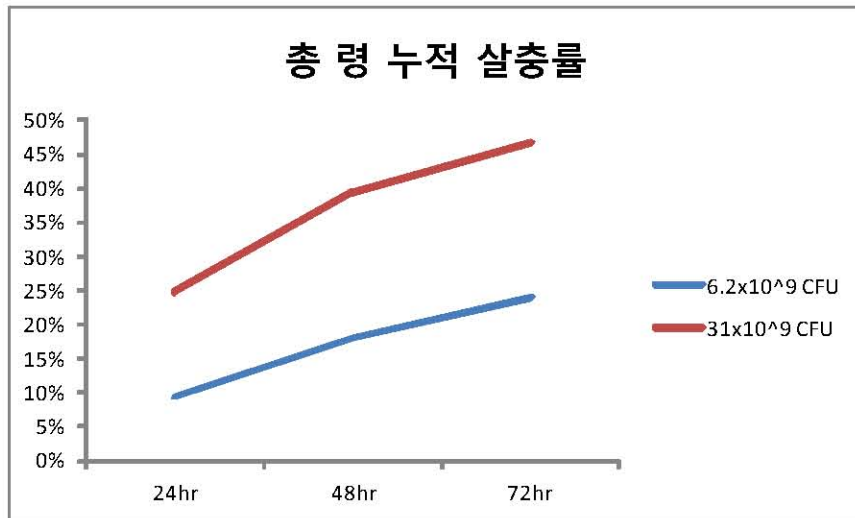
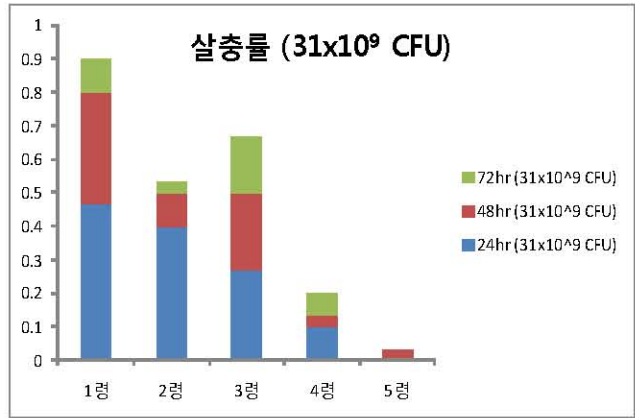
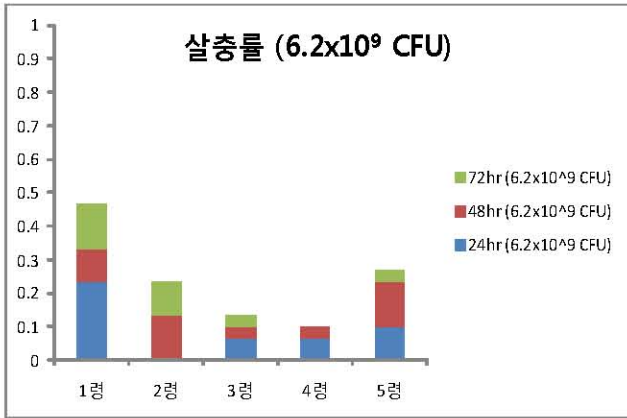


그림 5-9. 대량배양용 저가매지를 이용한 꿀벌부채명나방 방제용 미생물 살충제(B.t)의 살충력 검정

제 6 절 낭충봉아부패병의 원인체 kSBV에 대한 초신속 정량 검사법의 개발

1. 서론

Sacbrood virus는 1913년에 처음 보고되었으며, 꿀벌 유충에 질병을 야기하는 심각한 virus성 질병 중 하나로 1964년에 그 특징이 규명되었다(Bailey, 1964). Sacbrood virus(SBV)는 *Iflavirus* 속에 속하며 Positive strand RNA를 가진 *Picornavirus*이다(Ghosh *et al.*, 1999). SBV는 꿀벌 유충에서 발병되며, 감염된 유충의 증상은 주머니(Sac)를 형성하며, 노란색에서 검은 갈색으로 점차 부패 되면서 번데기가 되지 못하고 죽게 된다(Bailey *et al.*, 1975).

일반적으로 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에서 검출되면 발견 지역에 관계없이 SBV라 통칭한다. 반면에, 동양종 꿀벌(*Apis cerana*)에서 검출된 SBV는 지역에 따라 염기서열 차이를 보이기 때문에 검출된 지역에 따른 명명을 사용한다. 중국에서 보고된 것은 Chinese Sacbrood Virus(CSBV)라 불리며(Ma *et al.*, 2011), 한국산 *Apis cerana*에서 검출된 SBV는 Korean Sacbrood Virus(kSBV)로 명명되었다(Han *et al.*, 2011).

꿀벌에서 질병을 검출해 내는 방법 중 PCR detection이 가장 sensitive하고 specific한 방법으로 인정 받고 있다. 본 연구에서 또한 개발된 kSBV의 검출용 변역크로마토그래피법은 별도 도구가 필요없는 매우 편리한 방법이기도 하나, 최소 10^5 바이러스/시료이상의 농도에서만 검출이 가능하며, 바이러스의 genome을 의 10^2 바이러스/시료수준에서도 검색해 낼 수 있는 PCR법과 민감도에서 크게 차이를 보이고 있다. 한편, Real-time PCR(RT-PCR) 방법은 fluorescence를 통해 target gene의 증폭이 실시간 monitoring을 할 수 있으며, 정량적, 정성적 분석이 가능하다.

최근 Chip에 기초한 Thermal cycler는 이전 general PCR 방법을 다른 thermal cycler와 비교하여 상당한 발전을 이루어 왔다. Chip-based Real-Time PCR thermal cycler GenSpector TMC-1000(Samsung, Korea)은 전체적인 PCR cycle 수행 시간을 줄일 수 있고, 형광 dye로 인한 실시간 monitoring 및 정량적, 정성적 분석이 가능한 기계이다. Glass-silicone based micro-chip은 열전도를 증가시키며, chip 전체에 균일한 온도를 준다(Cho *et al.*, 2006). 이로 인해 URRT-PCR cycle을 RT-PCR cycle 보다 더 빠르게 진행시킬 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 KSBV를 가장 빠르게 검출해 내고자, Total RNA 추출 시간을 최소화 하였고, 최소 시간화한 Reverse transcription 방법과, 2-step-URRT-PCR 방법을 이용하는 Ultra-Rapid Reverse-Transcription Real-Time PCR(URRTRT-PCR) method를 개발하고자 하였으며, 이 URRTRT-PCR method는 Korean Sacbrood Virus 뿐만 아니라, 꿀벌 질병에서 다른 virus의 검출 방법에 유용하게 적용될 것으로 기대하였다.

2. 재료 및 방법

가. Sample(Honeybee larvae)

본 연구에 사용된 시료는 옥천(Korea) larvae sample에서 KSBV(Genbank Accession Number. HQ322114)로 검출된 larvae를 사용하였다.

나. Total RNA isolation

Honeybee larvae 시료를 1.5ml Tube에 1마리를 넣고 Homogenizer로 larvae cell을 터트렸다. 그 후, R&A-Blue™(iNtRON), Chloroform을 넣고 vortexing하여 13000rpm 4℃ centrifuge를 10분간 하였다. 원심분리 후, 상등액에 존재하는 Total RNA를 사용하였다.

다. cDNA 합성 (Reverse Transcription)

cDNA 합성은 Total RNA를 1µg을 사용하였고, Oligo dT대신 Specific reverse primer를 사용하였다. dNTP, 100mM DTT, Reaction buffer, MML-V Reverse Transcriptase(Bionner Inc, Korea)를 사용하였으며, 42℃에 정치시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA 제작 시간은 각각 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min으로 다르게 하였다.

라. Plasmid construction

Template DNA를 확보하기 위해 KSBV genome(Genbank Accession Number, HQ322114)를 target으로 각 Primer set들의 DNA fragment를 PCR로 증폭 하였다. 증폭하여 확보한 DNA는 pBX, pGEM-3zf T-Cloning(in DH5αF'), double cut cloning으로 recombinant plasmid DNA로 확보하였다. Recombinant plasmid DNA는 각 PCR의 template DNA로 사용되었다.

마. Primer 제작

KSBV(Genbank Accession Number. HQ322114)의 Genome structure 내부 Open Reading Frame(ORF) 중 capsid protein, peptidase-c3g, RNA_ dependent_ RNA_ polymerase를 coding 하는 위치로 각각 특이 primer쌍을 제작하였다. URRT-PCR을 위해 Capsid protein 내부에 위치한 특이 Primer쌍을 제작하였다(표. 6-1; 그림 6-1).



그림 6-1. Located specific primer set in Korean Sacbrood Virus genome (Genbank Accession Number HQ322114).

표 6-1. Oligo-nucleotide primer set information for for RT-PCR from kSBV specific target gene

Targ et	Primer	Sequence (5'→3')	Length (mer)	T _m (°C)	Product size (bp)	Refer ence
kSBV	kSBV-c3F(+)	GAT AGA TCT CCA GCG CGT GTT GAG TTT GTT	30	60	823	This study
	kSBV-C3R(+)	GTA GTC GAC TAC TGG GTC CTT CCC AAT CTT				
	kSBV-vp1-F	GCT GGA TCC TGG ATG CCT ATA AAT TCA ATT	30	49	528	
	kSBV-vp1-R	GCT GTC GAC AAC TTT GTA CGA CAT TCC CGC				
	kSBV-URRT	CTT ACG CTA AGT GCG	18	59	257	
	-F	CGC				
	kSBV-URRT	AGC ACG ATG ATA TCT	21	54		
	-R	AAA GGG				
	kSBV-RdRp-	CAC GGA TTC AAG CGA	27	51	894	
	eF	AAA TCC GAG TTG				
	kSBV-RdRp-	CCG GTC GAC TAT CCA	29	49		
	eR	TTG AGT GGT ATC AT GAT GGA TCC ACG TTT				
	kSBV-vp2-F	AAT TGG GGA TCA GGC	30	57	582	
	kSBV-vp2-R	GAT GTC GAC AGT TGA CTG TTT TAA ACC ATG				

바. RT-PCR을 사용한 Primer 선별

kSBV genome에 대한 특이 primer쌍(Table 1)의 최종 형광값을 비교하였다. 각각의 Primer쌍에 대한 Recombinant plasmid DNA는 2.49×10^5 molecules가 사용되었고, 5 pmole의 Primer sets, 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)가 Total 20 μ l로 구성되어 Real-Time PCR 반응에 사용되었다. Real-Time PCR 조건은 Pre-denaturation 94 °C 10sec, denaturation 94 °C 5 sec, Annealing/Extension 60 °C 5 sec의 조건으로 50 cycle 진행하였고, PCR product의 Melting analysis는 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다.

사. Temperature gradient RT-PCR

각 Primer set의 최적 Annealing 온도 조건은 Gradient RT-PCR로 수행하였다. RT-PCR 반응에는 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD), forward, reverse primer set 5pmole, 2.49×10^5 molecules of target DNA가 사용되었고 총 20 μ l volume으로 수행하였다. Gradient Real-Time PCR은 Exicycler™ Quantitative Thermal Block(Bioneer)로 수행하였고, PCR 조건은 Pre-denaturation 94 °C 10 sec, denaturation 94 °C 5 sec, Annealing/Extension

42 ~ 70.67 °C 5 sec의 조건으로 50 cycle 진행하였고, PCR product의 Melting analysis는 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다.

아. RT-PCR을 사용한 sensitivity Test

kSBV-VP2 primer set의 sensitivity test를 위하여 pGEM-kSBV-vp2 plasmid(kyonggi korea)를 serial dilution하여 2.49×10^{71} molecules의 Template를 구성하였다. Real-Time PCR에는 kSBV-URRT primer는 5 pmole, 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)을 사용하였다. Real-Time PCR 조건은 Pre-denaturation 94 °C 10 sec, denaturaton 94 °C 5 sec, Annealing/Extension 60 °C 5 sec의 조건으로 35 cycle 진행하였고, PCR product의 Melting analysis는 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다.

자. 풀벌 Genomic DNA의 오염 하에 specific RT-PCR의 sensitivity Test

Contamination Test는 KSBV-vp2 primer의 민감도 test에 D.W의 일부대신 Honeybee Genomic DNA 1µg을 사용하고 나머지 조성과 조건은 동일하였다.

차. Ultra-Rapid Real-Time PCR을 사용한 Denaturation, Annealing/Extension 온도의 최적화

KSBV-vp2 primer set의 2-step URRT-PCR을 사용한 온도 조건 최적화는 Pre-denaturation 은 95°C 10 sec로 진행 하였고, 최적 Denaturation 온도는 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C 2 sec로 다르게 하고 Annealing/extension은 60 °C로 고정하여 50 cycle을 수행하였다. 최적 Annealing/Extension 온도를 알기 위해 58 °C, 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C 5 sec로 다르게 하였고 Denaturation 온도는 95 °C로 고정하여 50 cycle을 수행하였다. Melting analysis는 70 °C 부터 90 °C (0.5 °C/sec)까지 진행하였다. 2-step URRT-PCR은 2.49×10^7 molecules of target DNA를 사용하였으며, 10 pmole KSBV-VP2 primer sets와 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)를 Total volume 6 µl로 조성하여 수행하였다.

카. URRT-PCR을 사용한 Primer 민감도 test

KSBV-vp2 primer set의 sensitivity test를 위하여 pGEM-kSBV-vp2 plasmid(kyonggi korea)를 serial dilution하여 2.49×10^{71} molecules의 Template를 구성하였다. kSBV-vp2 primer set의 2-step URRT-PCR을 사용한 온도 조건은 Pre-denaturation 95°C 10 sec으로 진행 하였고, Denaturation 95 °C 5 sec로 하였으며, Annealing/Extension 온도는 60 °C 5 sec 로 구성하여 50 cycle을 수행하였다. Melting analysis는 70 °C부터 90 °C (0.5 °C/sec)까지 진행하였다.

타. URRT-PCR의 각 step 시간 최소화

2-step URRT-PCR 조건을 Pre-denaturation 95°C 10 sec으로 하였으며, Denaturation 95 °C를

2 sec, 1 sec으로 하였고, Annealing/Extension 60 °C를 5 sec, 4 sec, 3 sec으로 하여 PCR을 진행하였다. 2-step URRT-PCR은 2.49×10^7 molecules of target DNA를 사용하였으며, 10 pmole KSBV-vp2 primer sets와 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)를 Total volume 6 μ l로 조성하여 수행하였다.

RT-PCR condition의 Pre-denaturation 94 °C는 10 sec으로 Denaturation 94 °C는 5 sec → 3 sec → 2 sec으로 Annealing/Extension 60 °C 5 sec → 4 sec → 3 sec 으로 시간을 줄이며 RT-PCR을 수행 하였다. PCR product의 Melting analysis는 76°C에서 86°C까지 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Real-Time PCR을 사용한 Primer 선별

kSBV genome을 기반으로 제작된 각각의 특이 primer sets(Table 1)들은 각각의 10^5 , 10^4 molecules of target DNA를 RT-PCR 증폭하였다. 각 Primer sets를 10^5 에서 확인한 결과 각각 Primer set KSBV-URRT, KSBV-vp1, KSBV-c3-823, KSBV-vp2, KSBV-RdRp은 12.96, 24.54, 22.80, 20.19, 29.37의 Threshold cycles (C_T value)값을 보였다(Fig. 2. and Table 2). KSBV-vp2 primer set는 RT-PCR의 최종 형광 값에서 가장 높은 수치를 보였다(그림. 6-2).

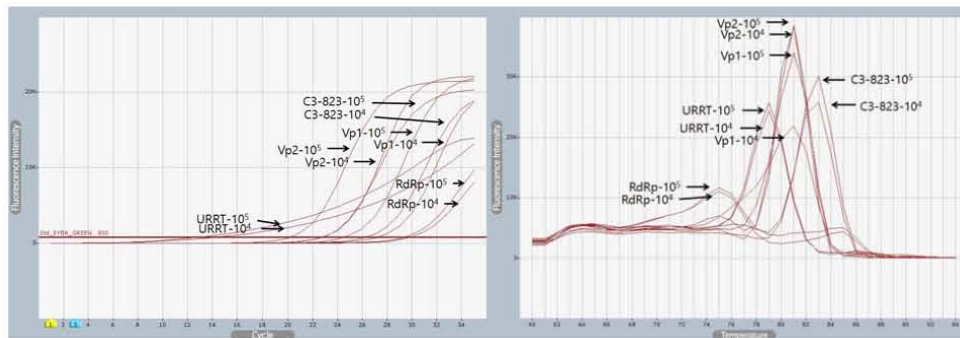


그림 6-2. Primer selection using Real-Time PCR and Melting analysis of RT-PCR product.

각 Primer set에 대한 Target gene을 Real-Time PCR한 결과 kSBV-vp2 primer set에서 가장 높은 수치의 형광 값이 확인되었다(표 6-2).

표 6-2. Ct value of Real-Time PCR result

Primer Name	KSBV-URRT		KSBV-VP1		KSBV-c3-823		KSBV-vp2		KSBV-RdRp	
Molecules of Target DNA	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4
Ct value	12.96	14.39	24.54	27.23	22.80	26.27	20.19	22.77	29.37	29.88
Tm (°C)	79	79	81	80.5	82.5	82.5	80.5	81	75	75
Final fluorescence value	9630	8420	21375	16942	20117	17746	21996	21427	7277	5798

나. RT-PCR을 사용한 KSBV-vp2 primer의 최적 Annealing temperature

KSBV-vp2 primer의 temperature Gradient Real-Time PCR의 결과는 42 ℃ 부터 64 ℃까지의 온도 범위에서 PCR product의 생성량에 큰 영향을 주지 않았으며, 60 ℃부터 64 ℃ 이상의 온도 조건에서 PCR product의 농도가 점차 줄어드는 것이 확인되었다.

다. RT-PCR을 사용한 Primer sensitivity test

KSBV-vp2 plasmid의 serial dilution에 따른 KSBV-vp2 primer set의 sensitivity test 결과 10^2 molecules of target DNA 까지 Detection 할 수 있는 것이 확인되었다(Fig. 4). 끝별 Genomic DNA의 존재 하에 수행한 Contamination test 결과는 10^2 molecules of target DNA 까지 검출 해 낼 수 있는 것이 확인되었다(그림 6-3).

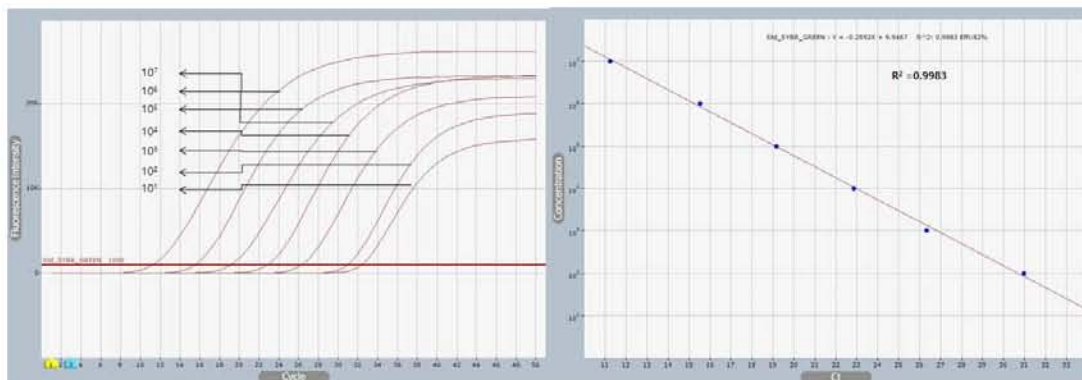


그림 6-3. Sensitivity test of KSBV-vp2 primer set using RT-PCR and standard curve.

kSBV-vp2 primer set의 Real-Time sensitivity test결과 10^2 molecules of target DNA까지 증폭되는 것이 fluorescence graph에서 확인되었다.

kSBV-vp2 primer를 사용하여 RT-PCR결과, 10^2 molecules of target DNA까지 detection 가능한 것으로 판단된다.

라. RT-PCR 각 step의 시간 축소

kSBV-vp2 plasmid DNA의 10^5 molecules of target DNA를 사용하여 2-step RT-PCR 조건에서 Denaturation과 Annealing/Extension 시간을 각각 30 sec으로부터 각각 2 sec, 3 sec으로 줄인 결과에서도 PCR 증폭이 Graph로 확인되었다(그림 6-4).



그림 6-4. PCR 조건에서 denaturation과 annealing/extension 최소화 시간을 확인한 RT-PCR graph

KSBV-vp2 primer를 사용한 RT-PCR에서 denaturation 시간을 2초, annealing/extension시간을 3초로 하였을 때, 최종 형광 값이 가장 높게 확인되었다.

마. cDNA synthesis 시간 축소

꿀벌 Larvae(옥천, Korea)로부터 추출한 Total RNA를 1ng사용하여 cDNA를 제작하였다. MML-V Reverse Transcriptase (Bioneer)를 사용한 cDNA는 42°C 1, 2, 3, 4, 5, 15, 30, 60 분간 반응 하였다. 제작된 cDNA의 양을 KSBV-vp2 primer를 사용하여 Real-Time PCR로 확인 하였다.

Real-Time PCR 결과 29.56, 29.55, 29.43, 28.75, 28.54, 28.38, 27.57, 26.14의 Threshold cycles (C_T value) 값을 보였다(그림 6-5; 표 6-3).

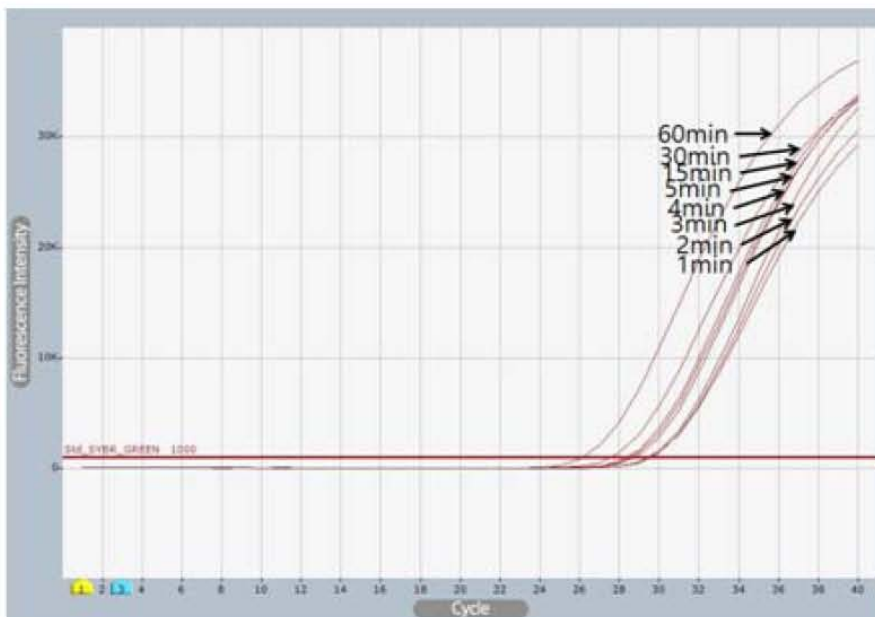


그림 6-5. Quantitative amplification based on various times of RTase incubation.

표 6-3. Ct value of RT-PCR

cDNA synthesis time(minute)	1	2	3	4	5	15	30	60
Ct value	29.56	29.55	29.43	28.75	28.54	28.38	27.57	26.14

바. KSBV-URRT detection limit 민감도 test

KSBV-vp2 plasmid DNA는 $10^{7.1}$ molecules로 Serial dilution하여 sensitivity test하였으며, kSBV-vp2 primer의 detection limit은 2.49×10^3 molecules of target DNA 까지 detection 할 수 있었다(Fig. 6-6).

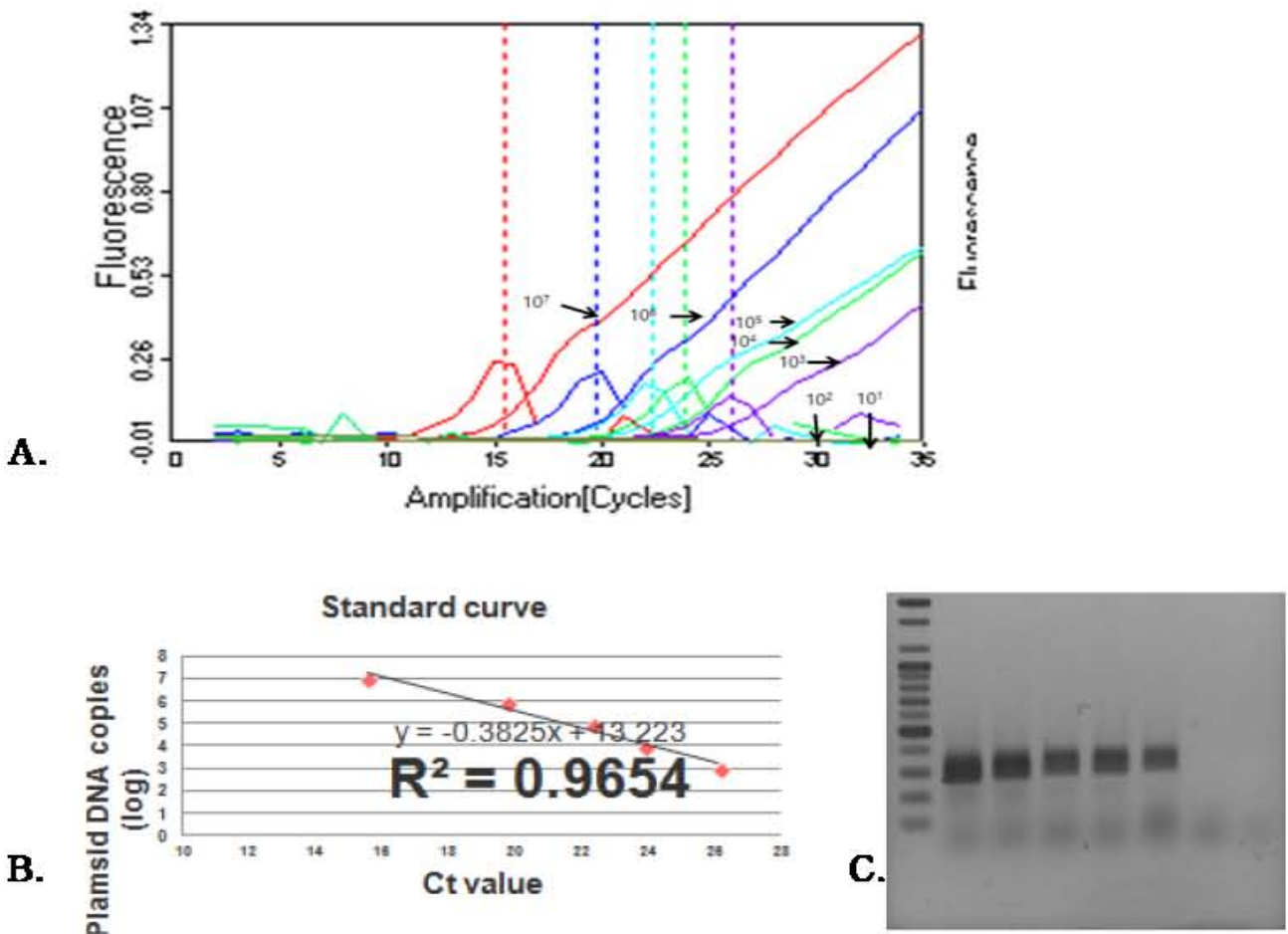


그림 6-6. Detection sensitivity using kSBV-vp2 primer for 2-step URRT PCR

pGEM-kSBV-vp2 plasmid를 serial dilution하여 $2.49 \times 10^{7.654,3,2,1}$ molecules의 Template를 사용하였다. kSBV-URRT primer set의 2-step URRT-PCR을 사용한 온도 조건은 Pre-denaturation 95℃ 1 min 진행 하였고, Denaturation 온도는 95 ℃ 15 sec 로 구성하였으며, Annealing/Extension 온도는 60 ℃ 20 sec 로 구성하여 35 cycle을 수행하였다. Melting analysis는 76 ℃부터 90 ℃ (0.5 ℃/sec)까지 진행하였다. kSBV-vp2 primer의 detection limit

는 2.49×10^3 molecules of Target gene까지 검출할 수 있다. A는 각 initial template에 대한 형광그래프이며, B는 회귀(regression)을 이용한 정량값이고, C는 각 PCR의 전기영동사진임.

사. Detection 할 수 있는 2-step URRT-PCR 최소화 시간

kSBV-vp2 plasmid DNA의 10^7 molecules of target DNA를 사용하여 2-step URRT-PCR 조건의 Denaturation과 Annealing/Extension 시간을 줄인 결과 Denaturation 1 sec, Annealing/Extension 3 Sec의 시간에서도 kSBV-vp2 Primer의 PCR 증폭이 Graph로 확인되었다.

각 step에 주어진 시간을 30초에서 3초로 줄인 결과, 높은 양의 initial template (10^7)를 사용한 URRT-PCR에서는, 낮은 양의 initial template (10^1)의 URRT-PCR에 비하여 Ct값의 차이가 상대적으로 작게 나타났다. 각 primer들과 template간의 비가 전자에 유리함을 보여준다 (그림. 6-7; 그림 6-8).

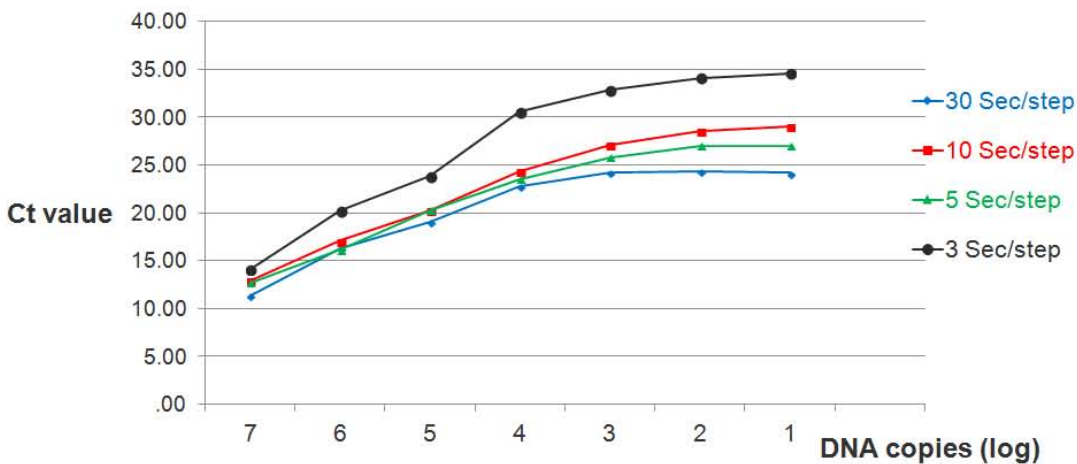


그림 6-7. kSBV 진단 시간을 최소화 하기위한 URRT-PCR 중 각 cycle step 시간의 최소화

URRT-PCR은 Pre-denaturation 95℃, 10 sec으로 하였으며, Denaturation은 95 ℃를, Annealing/Extension은 60 ℃를 사용하고, 각 PCR은 40 cycle 진행하였다. 2-step URRT-PCR 은 10^7 까지 10^1 까지 희석된 target DNA를 각기 사용하였으며, 10 pmole kSBV-URRT primer sets와 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)를 사용하였고, Total volume 6 ul로 조성하여 수행하였다.

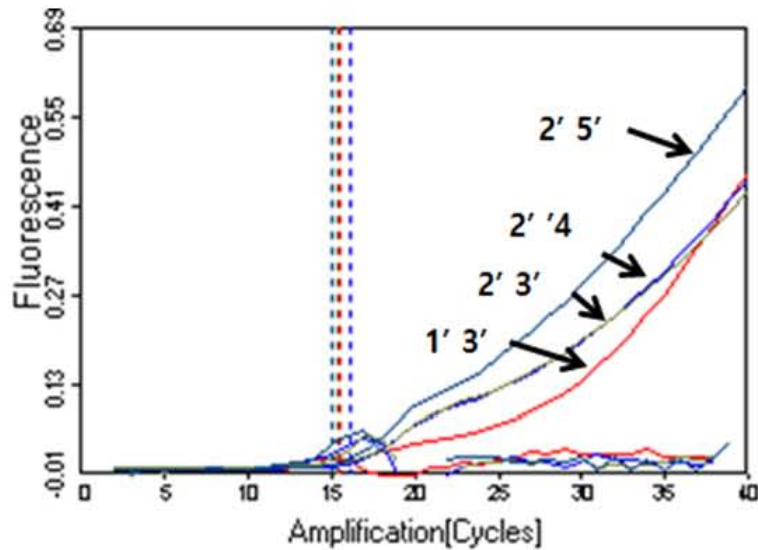
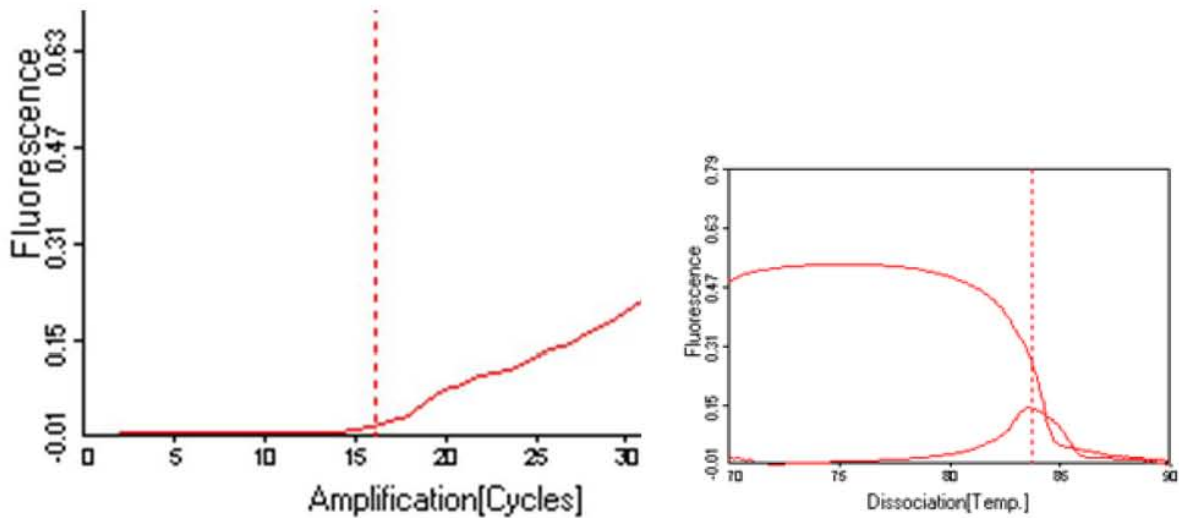


그림 6-8. kSBV 진단 시간을 최소화 하기위한 URRT-PCR: 각 cycle 중 각 step 시간의 최소화

URRT-PCR 조건을 Pre-denaturation 95℃ 10 sec으로 하였으며, Denaturation 95 ℃를 2 sec, 1 sec으로 구성하였고, Annealing/Extension 60 ℃를 5 sec, 4 sec, 3 sec으로 구성하여 PCR을 40 cycle 진행하였다. 2-step URRT-PCR은 2.49×10^7 molecules of target DNA를 사용하였으며, 10 pmole kSBV-URRT primer sets와 2X SsoFast™ EvaGreen® Supermix(BIORAD)를 Total volume 6 ul로 조성하여 수행하였다. URRT-PCR 조건의 각 step 시간을 최소화한 결과 Denaturation 1 sec, Annealing/Extension 3 sec 의 조건에서도 PCR 증폭이 확인되었다.

아. 가장 빠른 detection 방법을 이용한 kSBV 진단

kSBV-URRT primer를 사용하여 95℃ pre-denaturation 1 min, 95℃ Denaturation 1 sec, 60℃ Annealing/Extension 3sec URRT-PCR 결과, 30cycle을 진행하는데 총 9 min 29 sec의 시간이 소요되었고, detection에 소요된 시간은 4 min 36 sec 만에 15.41 C_T 값에서 kSBV 진단이 확인되었다(그림 6-9).



A

B

그림 6-9. 2-step Ultra-Rapid Real-Time PCR을 사용한 가장 빠른 kSBV Detection

(A) URRT-PCR Ct graph using KSBV-URRT primer set, (B) Melting analysis

kSBV-URRT primer를 사용하여 95℃ pre denaturation 1min, 95℃ Denaturation 1 sec, 60℃ Annealing/Extension 3sec 의 조건에서 반응을 진행하였다. 2-step Ultra-Rapid Real-Time PCR은 총 9 min 29 sec 진행 되었으며, 4 min 36 sec /15.41 Ct 값에서 KSBV 진단이 확인되었다.

본 연구는 가장 빠른 PCR 진단을 하기 위하여 RT-PCR 조건의 각 회전 중 각 step의 시간을 줄이고자 노력하였으며, 3-step PCR을 2-step PCR로 줄여서 Annealing과 Extension을 합쳐 진행하였고, denaturation 30 sec. annealing/extension 30 sec의 시간으로부터 denaturation 2 sec, annealing/extension 3 sec으로 줄인 결과, RT-PCR 조건 각 step의 시간을 줄여도 target gene 증폭이 충분히 가능한 것을 확인하였다.

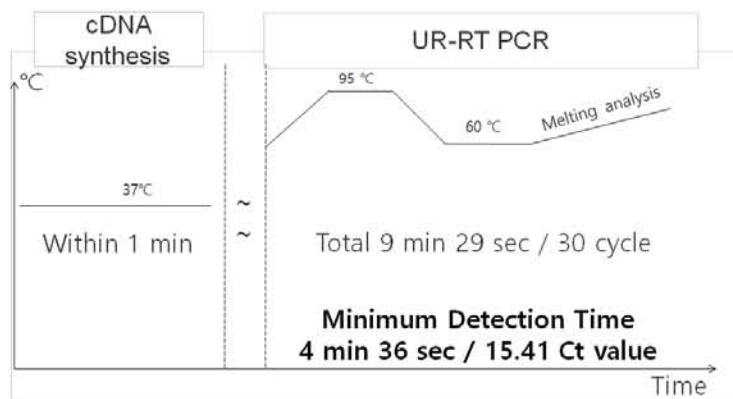
또한, kSBV의 target gene을 확보하기 위한 cDNA 합성과정에서도, larvae에서 추출한 Total RNA를 사용하여 42 ℃에서 MML-V Reverse Transcriptase (Bioneer)의 반응시간을 최소 1분으로 하여도 kSBV-specific gene을 증폭시킬 수 있음을 증명하였다. 이는 기존에 사용되었던 60 min 반응 결과의 Ct 값과 3.42의 차이를 보였으나, 1 분 이내의 Reverse Transcription 반응에서도 충분한 초기 Template 제작이 가능한 것을 보여준 것이다.

KSBV-vp2 primer를 사용한 2-step URRT PCR의 최적화는 95 ℃의 Denaturation, 60℃의 Annealing/Extension에서 형광 값이 가장 높게 확인되어 최적조건으로 하였다. Sensitivity test 는 KSBV-vp2 plasmid DNA를 serial dilution 하였으며, detection limit는 2.49×10^3 molecules of target gene까지 증폭 할 수 있는 것이 확인되었다. 가장 빠른 검출을 위해 2-step URRT-PCR 조건의 95℃ Denaturation과 60℃ Annealing/Extension 시간은 1 sec, 3 sec 까지 줄일 수 있었으며, 2-step URRT-PCR의 전체 시간은 총 9 min 29 sec/30 cycle이며,

melting analysis를 제외한 minimum detection time은 C_T 값 15.41 일 때 4 min 36 sec로 확인되었다.

따라서, 본 연구에서는 KSBV를 가장 빠르게 검출하기 위한 방법으로 cDNA 제작 시간을 1 min의 시간을 두고, 2-step Ultra-Rapid Real-Time PCR을 사용하여 C_T 값 4 min 36 sec minimum detection time으로 총 5 min 36 sec의 초고속 진단 방법을 제안하게 되었다(그림 6-10).

향후 이 실험법은 kSBV 뿐만 아니라 다른 꿀벌 virus 검출 방법, 그리고 수많은 RNA virus의 검출에도 적용되어, 이들을 검색할 수 있는 유용한 방법으로 확장될 것을 기대한다.



(개선 예정)

그림 6-10. KSBV를 가장 빠르게 진단하기 위한 URRTRT-PCR model.

최소 시간화된 cDNA synthesis 방법과, 최소 시간의 2-Step Ultra-Rapid Real-Time PCR 방법을 사용하여 Korean Sacbrood virus를 가장 빠르게 검출하기 위한 UR-RT-RT PCR model KSBV Minimized Detection model을 사용하여 cDNA synthesis, melting analysis 포함 detection time은 총 10 min 29 sec / 30cycle 이며 Minimum Detection Time은 cDNA synthesis 포함 5 min 36 sec / 15.41 C_T 값에서 KSBV를 진단할 수 있었다.

제 7 절 석고병과 백목병의 특이 PCR을 이용한 신속 현장 진단법의 개발

1. 서론 및 요약

석고병과 백목병은 꿀벌의 주요 진균성 질병이며, 감염된 유충의 사체가 비슷한 외형을 보이는 이유로 질병의 명칭이 혼용되어 사용되고 있으나, 각기 *Aspergillus flavus*와 *Ascosphaera apis*에 의해 발생되는 꿀벌 질병이다. 기존 석고병과 백목병의 PCR 기반 진단법의 경우, 최소 17분에서 1시간이 소요되며 보통 결과 확인을 위하여 전기영동과 같은 추가 과정이 요구되었다. 본 연구에서 개발된 진단법은 형광 염료인 SyBr green을 이용하여 육안으로 확인할 수 있는 간편성과 보다 빠른 현장 진단을 목적으로 추구되었다. 석고병의 경우 최소 8분 38초 내에 진단이 가능하였으며, 10^3 분자의 target DNA도 검출할 수 있음을 확인하였다. 본 연구에서는 꿀벌의 진균성 질병의 병원균 중 *Aspergillus flavus*와 *Ascosphaera apis*에 대한 새로운 현장 진단법을 제시하고자 한다.

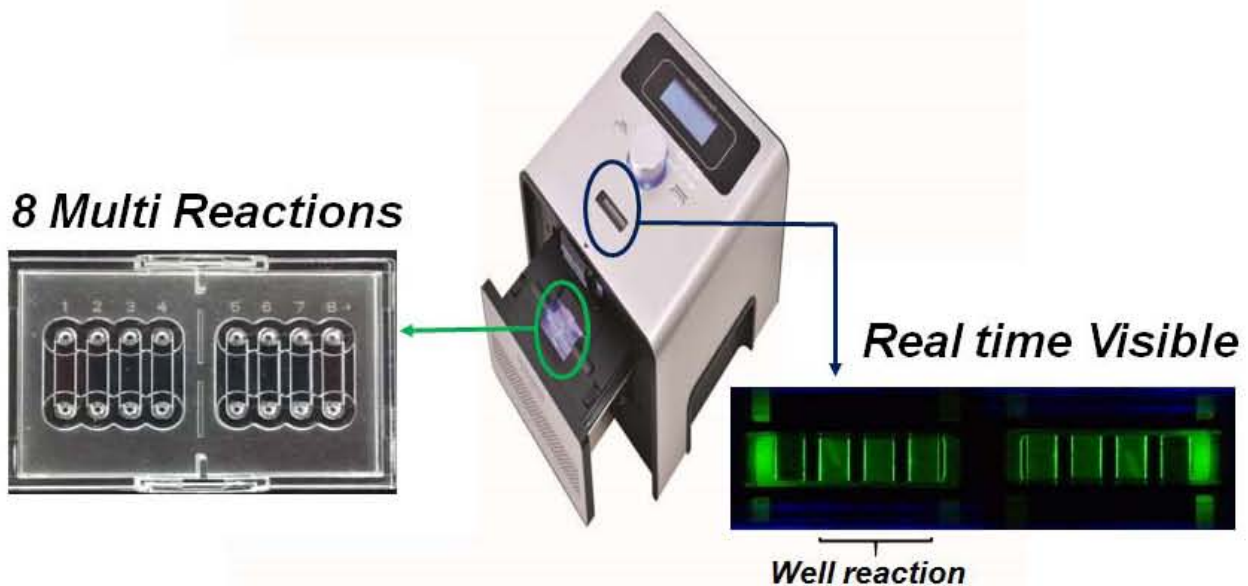


그림 7-1. 본 과제의 기술에 의하여 개발된 기기로서 초고속 PCR 및 8개의 PCR반응에 대한 실시간 모니터링이 가능한 thermocycler. (상품명은 high performance PCR기)

백목병은 *Ascosphaera apis*에 의하여 감염되는 진균성 질병이며, 석고병은 *Aspergillus* 속의 진균들에 의하여 발병된다. 석고병 발병을 일으키는 대표적 원인균 중 하나가 *Aspergillus flavus*이다. 이들은 주로 유충에게 감염되며, 병원성 포자가 유충의 중장관에 유입하여 자라는 등 백목병과 주요 증상과 감염 경로가 유사하다. 그 뿐만 아니라 딱딱하게 굳은 사체의 모습이 유사하여 육안으로 쉽게 구별이 어렵다(Bayley 1967, Puerta et al 1994, Deans 1940, De Jong 1977, Bailey 1981). 국내에서도 석고병과 백목병을 혼동하여 사용하고 있다.

서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)과 동양종 꿀벌(*Apis ceranae*) 모두를 대상으로 한 12 종의 꿀벌 질병에 대한 국내 발병 현황 조사에서, 백목병은 4.51%의 발병률을 보였으며, 석고병은 37.05%의 발병률을 보였다. 이는 12 가지의 질병 중 BQCV 다음으로 가장 높은 발병률로 나타났다. 그 뿐만 아니라 석고병은 여름을 제외한 삼계절 내내 높은 발병률을 보이고 있다. 석고병과 백목병을 종합하면 발병률은 41.56%로 국내에서 매우 높은 발병률을 보이며 꾸준히 질병이 퍼져 가고 있음을 알 수 있다(Yoo et al. 2014).

본 연구에서 개발된 진균성 질병에 대한 진단법은, 석고병과 백목병의 병원체의 정량적 발견을 토대로 하는 것이며, 각 특이 유전자를 증폭시키고, 이를 형광 염료 SyBr Green을 이용한 형광을 통하여 육안으로 관찰하는 방법이다. 본 실험법은 빠른 열전도가 가능한 고유의 chip을 사용하며, 일반 PCR에 비하여 신속하게 PCR을 진행되도록 하였다.

*Ascosphaera apis*의 경우 Real Time PCR 진단법(Lee et al. 2006)과 LAMP 진단법(Lee et al. 2011) 등이 개발된 바 있으며, Real Time PCR 진단법은 30 분, LAMP 진단법의 경우 1 시간의 PCR시간이 요구되었다. Real Time PCR 진단법의 경우 10^2 수준의 DNA 분자까지 진단 가능했으며, LAMP 진단법의 경우 10^3 수준의 DNA 분자까지 진단 가능하였다.

한편, *Aspergillus flavus*의 경우 LAMP 진단법(Lee et al. 2013)과 Real time PCR 진단법(Bu, 2005) 등이 개발된 바 있으며, LAMP 진단법은 1 시간, Real time PCR 진단법은 약 1시간 30 분 정도의 PCR시간이 요구되었다. Real Time PCR 진단법의 경우 10^4 수준의 염색체 DNA 분자까지 진단 가능했다.

따라서, 본 연구에서는 꿀벌의 진균성 질병의 병원균 중 *Aspergillus flavus*와 *Ascosphaera apis*에 대해 기존 PCR 기반의 진단법보다 빠르고, 보다 민감한 현장 진단에 유용한 진단법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 수집과 DNA 순수 분리

제주대 양봉장으로 부터 석고병과 백목병에 감염된 유충 시료를 확보하였다. 시료는 습기제거제를 포함하여 실온 보관하였다. 꿀벌 시료는 마그너라이저(Roche, Korea)를 사용해서 분쇄하였고, Accu prep Genomic Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 순수분리 하였다. *Ascosphaera apis*와 *Aspergillus flavus*의 재조합 DNA는 경기대 유전학 실험실에서 확보하였다(Table 7-1). DNA 농도는 매스트로나노(MaestroGen, USA)를 사용하여 측정하였다.

Recombinant DNA name	reference
pBX-A.flavus	Hye-Min Lee, 2004, Korean J. Apiculture
pBX-A.apis	Hye-Min Lee, 2006. Korean J. Apiculture

표 7-1. Recombinant DNA list and reference

나. 프라이머의 설계

Name	Sequence(5'→3')	Product size (bp)	reference	
Asp 312 F	TCT AAA ATG AGA GTG	AAA GT	312	GeneBank D63696
Asp 312 R	CCT TCT TGA TCT ATT	TGT TGG C		Hye-Min Lee, 2004
QP Asco F	TTA GAG GGA CTA TCG	GTT CT	230	GeneBank M83264
				Hye-Min Lee, 2006
A.apis B3	ACA AGC TGA TGA CTT	GCG C		Boram Lee, 2011

표 7-2. Primer sets for detection of honeybee fungal pathogen.

프라이머들은 Exicycler™ 96(Bioneer, Korea)를 사용하여 Real Time PCR을 사용하여 가장 빠른 Ct값과 높은 증폭값을 갖는 프라이머쌍만을 선발하였으며, 유전자는 각 병원체 18s rRNA에서 선택되었다(표 7-2).

다. 초기 주형량에 따른 검출 한계 확인

본 연구에서 사용한 Real Time PCR 기기는 Exicycler™ 96 (Bioneer, Korea)이며 UF PCR 기기는 Genechecker™ (Gensystem, Korea)이다. 사용한 PCR mix는 SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad, USA)로 각 반응 당 PCR mix 5 μ l를 사용하였다. *Aspergillus flavus*의 경우 한 반응 당 2.5 pmole의 프라이머를 각각 사용하였고, *Ascosphaera apis*의 경우 한 반응 당 5 pmole의 프라이머를 각각 사용하였다. 초기 주형량은 재조합 DNA인 pBX-A.flavus와 pBX-A.apis를 10⁸분자 수준부터 10⁰분자 수준까지 희석하여 10⁶부터 10⁰의 분자 수준까지 검출이 되는지 확인하였다. 혼합물의 양은 총 10 μ l로 진행하였으며 PCR의 전기영동은 2% Agarose gel, 1% TAE로 진행하였다.

PCR 조건은 94°C pre-denaturation 100초 진행한 뒤 94°C denaturation 10초, 57°C annealing 10초, 72°C extension 10초씩 30 cycles를 기본으로 진행하였다.

라. 외부 DNA 오염에 따른 검출 한계 확인

초기 주형량은 재조합 DNA인 pBX-A.flavus와 pBX-A.apis를 10⁶분자 수준부터 10⁰분자 수준까지 희석하여 어떠한 질병에도 감염되지 않은 벌 성충의 염색체 DNA 1ng과 조성하였다. 초기 주형량의 검출 한계 결과와 비교하여 외부 DNA에 따라 받는 검출 한계 영향을 확인하였다. PCR 조성과 조건은 초기 주형량의 검출 한계 실험과 동일하게 진행하였다. 마찬가지로 혼합물의 양은 총 10 μ l로 진행하였으며 PCR의 전기영동은 2% Agarose gel, 1% TAE로 진행하였다.

마. 꿀벌 시료의 DNA에 의한 오증폭 가능성 확인

대조군은 재조합 DNA인 pBX-A.flavus와 pBX-A.apis의 10^6 분자 수준을 주형으로 하여 사용하였다. 석고병과 백목병에 걸린 유충 시료를 Accu prep Genomic Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA를 순수분리 하여 3 ng만큼 주형으로 사용하였다. 또한 *Nosema ceranae*에 감염된 성충의 시료 DNA를 사용하여 교차반응이 없는지 확인하였다. PCR 조성 조건은 초기 주형량의 검출 한계 실험과 동일하게 진행하였다. 마찬가지로 혼합물의 양은 총 $10\mu\text{l}$ 로 진행하였으며 PCR의 전기영동은 2% Agarose gel, 1% TAE로 진행하였다.

바. 최소 검출 시간 확인

재조합 DNA인 pBX-A.flavus와 pBX-A.apis의 10^5 분자 수준을 주형으로 하여 사용하였다. PCR 조성 조건과 전기영동은 타 실험과 동일하게 진행하였다. 94°C pre-denaturation을 30초로 고정하고 denaturation, annealing, extension 3 단계의 시간을 조절하여 최소 검출 시간을 알고자 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 프라이머 선택

각 병원균 마다 가장 빠르게 진단이 가능한 프라이머를 선정하기 위하여 Real Time PCR (Exicycler 96, bioneer)을 사용하여 Ct값을 측정하였다. 또한 중합 온도에 따라 각 프라이머의 Ct값 변화를 고려하기 위하여 모두 $50-60^\circ\text{C}$ 에서 gradient PCR을 시행하였다.

그 결과 *A.flavus*에서는 모든 프라이머가 $50-60^\circ\text{C}$ 범위에서 잘 작동하였으며 모든 프라이머가 53.33°C 에서 가장 낮은 Ct값을 보였다. *A.flavus*-163이 Ct값은 13.04로 제일 낮으나, 증폭량이 낮아 그 다음 낮은 Ct값을 갖는 Asp 312를 선택하였다. *A.apis*의 경우 50°C 에서 QP Asco F & *A.apis* B3가 가장 낮은 Ct값 24.69를 보여 진단을 위한 프라이머로 선택하였다(data not shown).

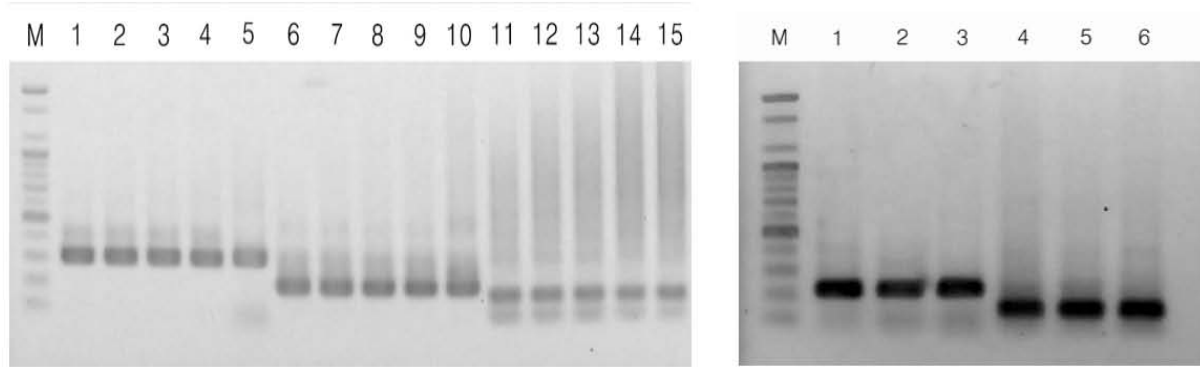


그림 7-1. *Ascospaera apis*와 *Aspergillus flavus* 특이 primer의 선발.

Lane M은 100bp ladder marker (bioneer). Primer concentration은 각 5 pmole/reaction. 좌측의 Lane 1 에서 5 는 Asp 312을 사용한 Real Time PCR의 결과이며, 각기 50°C, 53.33°C, 55.56°C, 57.78°C and 60°C의 annealing 온도를 사용하였다. Lane 6 에서 10은 A.flavus-199 primer를 사용한 Real Time PCR의 결과이며, 각기 50°C, 53.33°C, 55.56°C, 57.78°C and 60°C의 annealing 온도를 사용하였다. Lane 11 에서 15는 A.flavus-163 primer를 사용한 Real Time PCR의 결과이며, 각기 50°C, 53.33°C, 55.56°C, 57.78°C and 60°C의 annealing 온도를 사용하였다. 우측의 Lane 1 에서 3은 QP Asco primer를 사용한 specific Real Time PCR이고, Lane 4 에서 6은 QP Asco F & A.apis B3 primer를 사용한 specific Real Time PCR이고, 각각의 annealing 온도는 50°C, 55.56°C, 60°C 이었다.

나. 초기 주형량에 따른 검출 한계

각 병원균의 재조합 DNA 주형의 농도를 분자 수준으로 연속 희석하여 진단 한계를 알기 위하여 10^6 부터 10^0 까지 실험을 진행하였다. 각 병원균의 프라이머는 Real Time PCR을 이용하여 선택된 Asp 312와 QP Asco F & A.apis B3가 사용되었다.

pre-denaturation 94°C, 각 PCR 변성 단계 94°C, 신장 단계 72°C를 기준으로 중합 단계는 A.flavus는 57°C, A.apis는 55°C 기준으로 하였다. 반응 시간은 pre-denaturation 100초, 각 PCR 단계는 10 초로 총 30 cycle 기준으로 진행하였다.

그 결과 Asp 312의 경우 10^1 까지 아가로오스 겔 상에서와 UF PCR 창으로 본 형광 결과 모두 진단되는 것으로 나타났다(그림 7-2좌). QP Asco F & A.apis B3의 경우 10^1 까지 아가로오스 겔 상에서 진단되는 것으로 나타났으나, 육안으로 본 형광 결과에서는 10^3 까지는 양성, 10^2 와 10^1 은 의양성으로 나타났다 (그림 7-2우).

결과적으로 아가로오스 겔에서 모든 프라이머는 10^1 까지 진단이 가능하며, 육안으로도 10^3 까지 진단이 가능하다고 판단되었다. 이는 기존 진단법과 비교했을 때 더 낮은 양의 분자까지도 진단이 가능하다는 것을 의미한다.

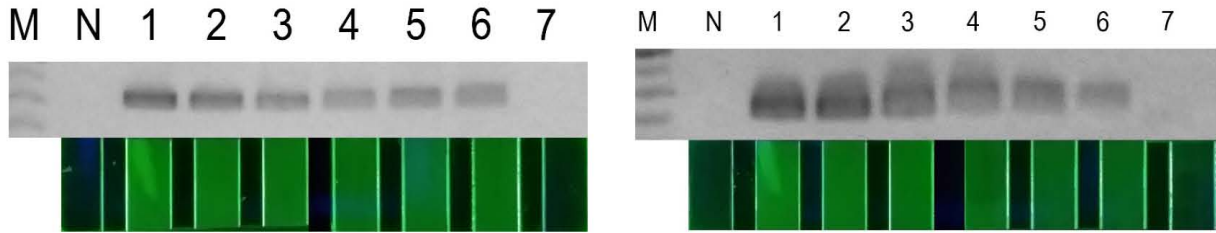


그림 7-2. UF PCR에 의한 *Ascosphaera apis*와 *Aspergillus flavus* 특이 검출 한계

Lane N 은 template없는 negative control이고, Asp 312 primer (좌측, *Aspergillus flavus*-특이)와 QPAscoF&A.apisB3 primer (우측,*Ascosphaera apis*특이)는 각 반응 당 2.5 pmole 씩 사용되었다. UF PCR은 2.83×10^6 molecules (Lane1)에서 2.83×10^0 molecules (Lane7)의 target gene을 template로 사용되었다.

다. 외부 DNA 오염에 따른 검출 한계

외부 DNA에 의하여 detection limit에 영향을 끼치는지 알기 위해 본 실험을 시행하였다. 주형으로써 재조합 DNA 10^6 부터 10^0 까지 희석하여 감염되지 않은 일반 꿀벌의 chromosomal DNA를 순수 분리하여 1ng과 각기 혼합하여 주형을 오염시켰다. pre-denaturation 94°C , 각 PCR 변성 단계 94°C , 신장 단계 72°C 를 기준으로 중합 단계는 *A.flavus*는 57°C , *A.apis*는 55°C 를 기준으로 하였다. 반응 시간은 pre-denaturation 100초, 각 PCR 단계는 10 초로 총 30 cycle 기준으로 진행한 결과 Asp 312의 경우 10^1 까지 아가로오스 겔 상에서와 UF PCR 창으로 본 형광 결과 모두 진단되는 것으로 나타났다(Fig 7-3좌). QP Asco F & A.apis B3의 경우 10^2 까지 아가로오스 겔 상에서 진단되는 것으로 나타났으나, 육안으로 본 형광 결과에서는 10^4 까지는 양성, 10^3 은 의양성으로 나타났고 10^2 은 의음성으로 나타났다(그림 7-3우). 오염된 DNA 주형 상태에서도 아가로오스 겔 상에서는 10^2 까지 진단이 가능하고, 육안으로도 10^3 까지 진단이 가능하여 양봉 현장시료나 외부 DNA의 유입에도 병원균에 특이적인 진단이 가능하다고 생각된다.

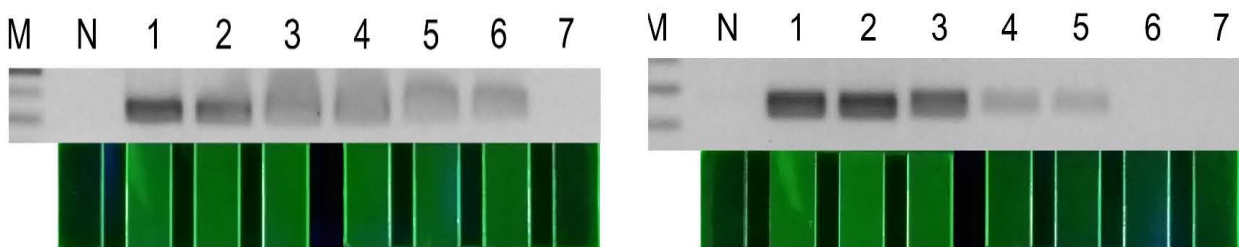


그림 7-3. 고농도 꿀벌 chromosomal DNA 존재하에서 UF-PCR의 검출한계

Lane N 은 template없는 negative control이고, Asp 312 primer (좌측, *Aspergillus flavus* 특이)와 QPAscoF&A.apisB3 primer (우측,*Ascosphaera apis* 특이)는 각 반응 당 2.5 pmole 씩 사용되었다. UF PCR은 2.83×10^6 molecules (Lane1)에서 2.83×10^0 molecules (Lane7)의 target gene을 template로 사용되었으며, 동시에 각 반응 당 1 ng의 꿀벌 chromosomal DNA가 부가되었다.

라. 실제 벌 시료의 DNA의 검출 가능성

실제 석고병과 백묵병에 감염된 시료의 chromosomal DNA를 사용하여 실제 현장에서 사용 가능한지 여부를 판단하였다. 또한 다른 질병과 교차반응이 일어나는지 판단하였다. 대조군으로 사용된 재조합 DNA는 10⁶분자 수준만큼 사용하였으며 각 병원균의 chromosomal DNA는 3ng 을 사용하였다. 사용된 병원균의 chromosomal DNA는 *A.flavus*, *A.apis*, *N.ceranae*로 Asp 312 와 QP Asco F & *A.apis* B3 모두 목표인 병원균의 chromosomal DNA에서 교차반응 없이 특이적으로 반응함을 확인하였다.

마. *Aspergillus flavus*와 *Ascospaera apis*의 검출을 위한 최소 검색 시간

최소 진단 시간을 알기 위하여 프라이머 Asp 312를 사용하여 진단을 진행하였다. 프라이머의 농도는 반응 당 각 5 pmole이며, 주형 DNA의 분자 수는 2.83×10^5 으로 사용하였다. 10분 33초의 UF PCR 조건은 pre-denaturation 30초, 변성 단계 3초, 중합 단계 3초, 신장 단계 3초씩 하여 총 30 cycles을 진행하였다. 8분 38초의 UF PCR 조건은 pre-denaturation 30초, 변성 단계 2초, 중합 단계 1초, 신장 단계 2초씩하여 총 30 cycles을 진행하였다. 10분 33초와 8분 38초 모두 아가로오스 겔과 UF PCR의 형광을 통하여 증폭했음을 확인하여 최단 8분 38초에서도 진단이 가능함을 확인하였다(그림 7-5).

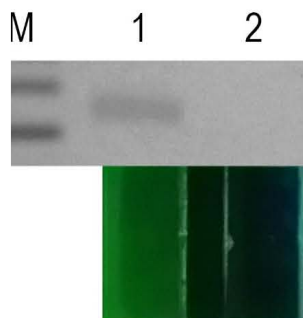


그림 7-5. *Aspergillus flavus*와 *Ascospaera apis*의 검출을 위한 최소 검색 시간

PCR condition은 pre-denaturation 30 sec, denaturation 2 sec, annealing 1 sec, extension 2 sec 이었으며 total 30 cycle을 수행하였다. 총 Running time은 8 min 38 sec이었다.

일반적으로 PCR 기반의 진단법은 민감하고 정확하다는 큰 장점이 있으나 현재까지 개발된 *Aspergillus flavus*와 *Ascospaera apis*의 검출을 위한 PCR 기반의 진단법은 신속하지 못하다는 단점과 이 이유로 현장에서 사용하기에 유용하지 않다는 점이 지적되어 왔다.

따라서, 본 연구는 충분히 신속하고 현장에서 사용하기 간편한 진단법을 개발하고자 하였으며, 주요한 진균성 질병 중 *Aspergillus flavus*와 *Ascospaera apis*를 대상으로 현장용 신속 PCR 진단법을 개발하게 되었다. 본 진단법을 통하여 *Aspergillus flavus*또는 *Ascospaera apis*를 현장에서 육안으로 형광값 관찰을 통해서 10³유전자 수준까지 검색될 수 있는 것으로 나타났으며, 검출을 위한 최소 반응 시간도 *A.flavus*는 30 cycles 기준으로 8분 38초로 나타나 현장 연구에서 보다 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대되었다.

제 8 절 방선균을 이용한 신 항병원체 물질의 개발

1. 난배양성 방선균을 분리하기 위한 신배양기술

가. 액상 배양시스템

액상배양 시스템은 본 실험실에서 개발한 신배양기술로 난배양성 토양세균의 배양을 위해 고안한 방식으로 현재 이 배양시스템을 이용하여 5명의 연구원이 새로운 신종발굴을 위해 매진하고 있다. 원리는 인공배지에서 포함하지 못하는 토양 내 알 수 없는 물질을 공급해 줌으로서 기존에 배양이 안 되던 세균을 배양하여 순수분리를 용이하게 하고자 자연 친화형 모델이다(Fig. 8-1; Fig. 8-2).

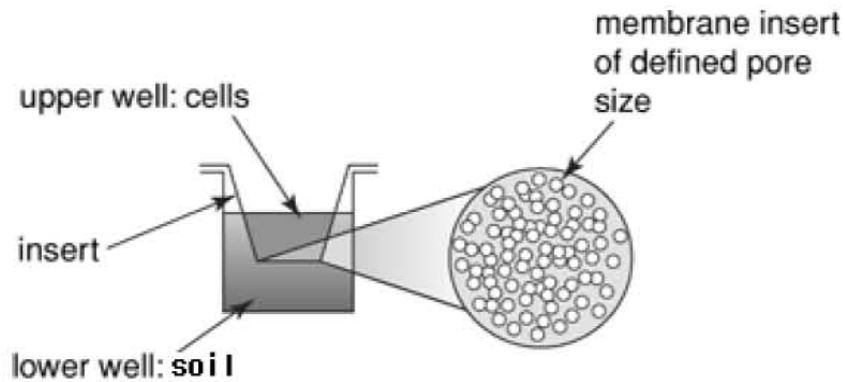


Figure 8-1. The principle of cultivation with soil for unculturable bacterial cells.

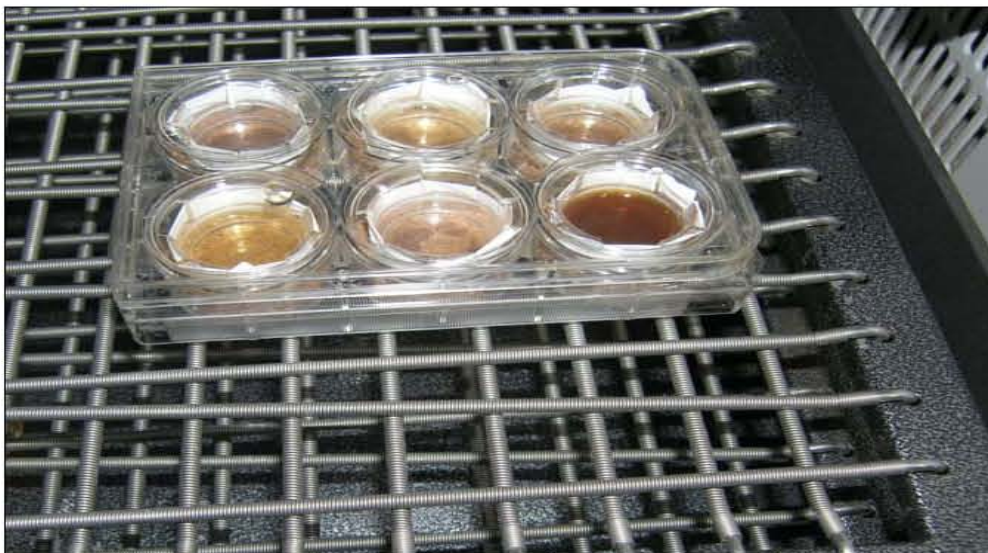


Figure 8-2. A set of an aerobic liquid culture system for unculturable soil bacteria.

나. 고체상 배양시스템

고체상 배양시스템은 원리는 액체상 배양시스템과 같고 다만 콜로니를 얻기 위해 membrane filter 위에 한천배지층을 얇게 만들어 사용하였으나(Fig. 8-3), 별 효과가 없어 같은 배지성분의 agar 배지를 사용하여 콜로니 유형에 따라 다양한 방선균을 분리하였다.

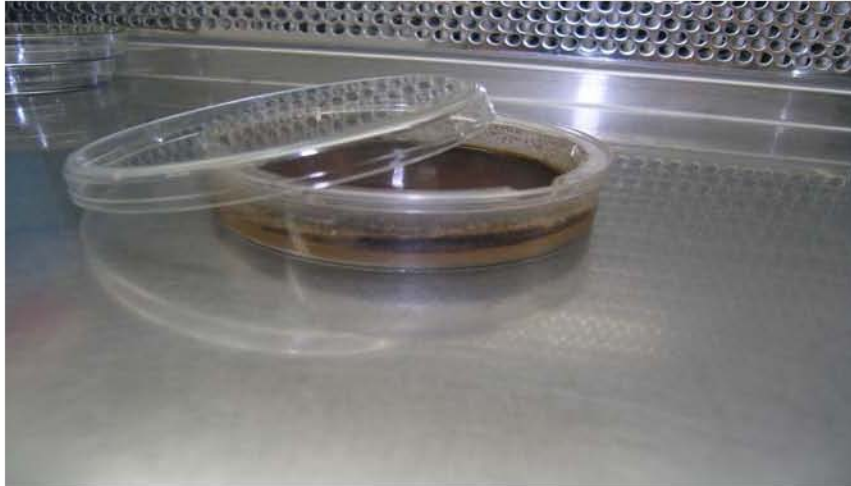


Figure 8-3. A set of a solid culture system for unculturable soil bacteria.

2. 항생물질을 생산하는 균주의 분리

가. 배지 및 배양

생리활성물질을 생산하는 균주를 분리하기 위하여 각종 토양시료를 채취하여, 토양시료 1 g을 60℃에서 30분간 건조하여 잘게 분쇄한 다음, 멸균된 증류수 9 ml의 멸균수에 현탁 후, 현탁액 1 mL을 새로 개발된 액상 신배양기술(위에 기술됨)을 이용하여 액상에서 집적배양(enrichment culture)을 한다.

이때 사용되는 배지는 humic acid-vitamin medium, BHI, B, 그리고 가장 많이 사용한 R2A, Lindenbein 변형배지 그리고 ISP 4로 조성은 Table 1-6에 나타나있다. 약 2주정도 배양 후 $10^3 \sim 10^6$ 정도의 희석을 거쳐 같은 배지의 agar plate(고체상)에 접종 후 colony가 발생할 때까지 배양시켰다.

Table 8-1. Composition of humic acid-vitamin agar medium

Humic acid	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
KCl	1.71 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
CaCO ₃	0.02 g
Distilled water	1 liter
Vitamin solution*	

*Vitamin solution contains 0.25 mg each of thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxin-HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid, and 0.25 mg of biotin.

Table 8-2. Composition of brain heart infusion (BHI) medium

Calf brain, infusion from	200 g
Beef heart, infusion from	250 g
Proteose peptone (Difco) or polypeptone (Bioquest)	10.0 g
NaCl	5.0 g
Na ₂ HPO ₄ *	2.5 g
Dextrose	2.0 g
Distilled water	1 liter

Dissolve ingredients of Medium 1 in distilled water with gentle heat.

* Difco does not specify waters of hydration.

Table 8-3. Composition of Bennett's (B) agar medium

Glucose	10 g
Yeast extract	1 g
Bacto-peptone	2 g
Beef extract	1 g
Distilled water	1 liter
Cycloheximide	50 ppm
Nalidixic acid	10 ppm
Vitamin solution *	

Table 8-4. Composition of R2A medium

Yeast extract	0.5 g
Proteose peptone N0. 3	0.5 g
Casamino acids	0.5 g
Glucose	0.5 g
Na-pyruvate	0.3 g
K ₂ HPO ₄	0.3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 g
Agar	15 g
Distilled water	1 liter

Adjust final pH to 7.2. adjust with crystalline

K₂ HPO₄ or K₂ HPO₄ before adding agar. Add agar, heat medium to boiling to dissolve agar, and autoclave for 15 min at 121 °C

Table 8-5. Composition of Benedict's modification of the Lindenein medium

Glycerol	20 g
L-arginine	2.5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
Distilled water	1 liter
Agar	20 g

Table 8-6. Composition of inorganic salts starch agar (ISP 4)

Soluble starch	10 g
CaCO ₃	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	1 mg
MnCl ₂ .7H ₂ O	1 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg
Distilled water	1 liter
Agar	15 g

나. Sampling sites

토양시료 전국적으로 7개의 지방 16곳에서 채취하여 방선균 분리에 사용되었고 (Table 8-7) 기타 해외 토양도 사용되었다.

Table 8-7. Sampling sites of soil in South Korea

서울	경기	강원	충청	전라	경상	제주
용산-2	고양-2	삼척-3	태안-4	순창-6	울릉도	제주-6
	과천-1	동해-1	서산-2	완도-5	독도	
	수원-4			진안		
	화성-4					
	시흥-6					

3. 방선균 library 구축

순수 분리된 균주는 20% glycerol이 함유된 brain heart infusion (BHI) 액체 배지(표 2)가 들어 있는 96 well plate의 각각의 well에 옮겨놓는다. 토양시료를 다양화하고 방선균분리 배지를 다양화함으로써 많은 종류의 방선균을 얻을 수 있어 2,000 균주이상을 확보하였다. 확보된 균주는 96 well plate 상에서 -20℃ 냉동고에 보관하였고 장기보관을 위해 플라스틱 챔튜브에 종류별로 glycerol를 처리를 한 후 역시 -20℃ 냉동고에 보관하였다. 또한 활성이 확인된 균주들은 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 동정을 하였고 이 균주들을 연구보전을 위해 동결건조를 통해 경기대내의 환경미생물은행에 보관중이다.

4. 테스트 균주

테스트 균주로는 미국부저병균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*와 석고병 진균인 *Aspergillus flavus* 그리고 백목병 진균인 *Ascospaera apis*을 확보하였고 현재 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* 및 나머지 두 개의 균주에 대한 항균테스트를 완료하였다. 또한, 병원성 세균인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, 진균인 *Candida albicans*, *Aspergillus niger* 등을 사용하여 항균능을 조사하였다. 테스트균주로 사용된균주의 목록은 Table 8-8에 나와 있다.

Table 8-8. List of test pathogens

Test pathogens	Collection number
<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i>	KACC 11540
<i>Aspergillus flavus</i>	KACC 45112
<i>Ascosphaera apis</i>	KACC 41775
<i>Bacillus subtilis</i>	KEMB 51201-001
<i>Staphylococcus aureus</i>	KEMB 4-659
<i>Escherichia coli</i>	KEMB 212-234
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KACC10185
<i>Candida albicans</i>	KACC 30003
<i>Aspergillus niger</i>	KACC 40280

5. 항균물질의 분석

항균물질의 분석을 위해서는 여러 가지 단계의 실험과정이 필요하다. 토양으로부터 방선균을 분리하는 것부터 시작하여 분리된 방선균주들의 항균능력을 가지고 있는지 꿀벌 병원성균들을 포함한 각종 병원성균들을 테스트하였다. 선별된 고효율 방선균들에 적합한 최적의 배양조건을 찾았다. 이 때 각 배양조건에서 가장 높은 항균능을 보이는 조건을 찾는 것이다. 최적의 조건에서 배양을 한 후 항균물질을 추출하고 순수분리하며 분리된 물질들의 효능을 검사하고 다량으로 순수분리를 통해 각각의 물질을 모아서 여러 가지 분석기기를 이용하여 구조분석 및 여러 가지 특징을 조사하였다. 아래의 그림은 전체 실험과정의 보여주는 모식도이다(Fig. 8-4).

Overview of main contents

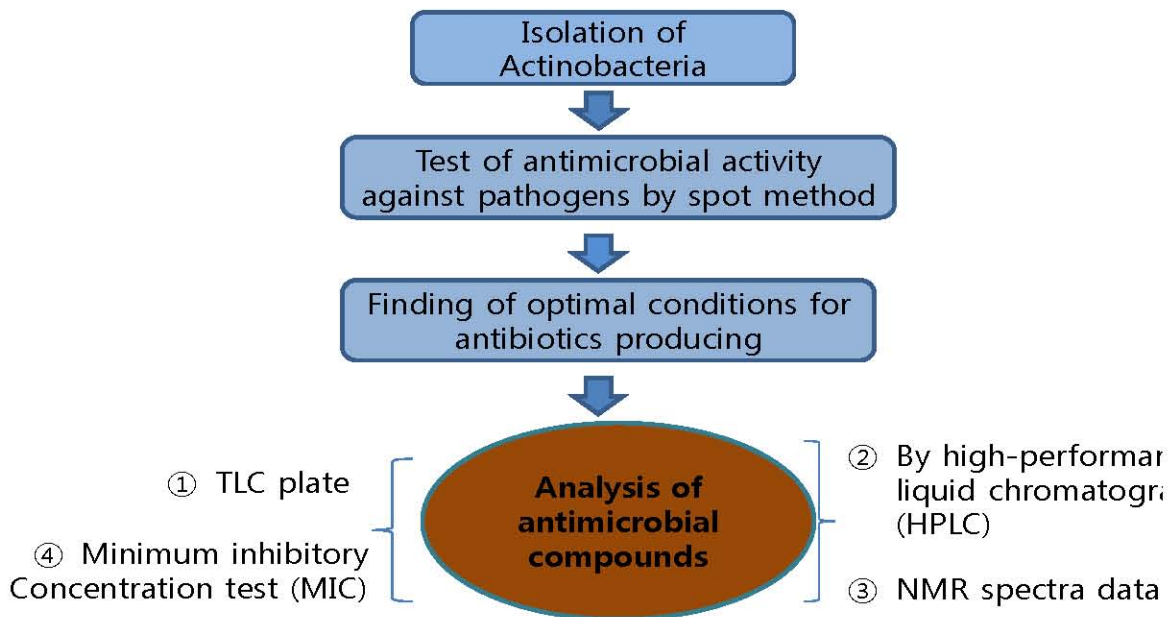


Figure 8-4. Experimental design for analysis of antimicrobial compounds

가. 발효(fermentation)

Glycerol stock에 있는 미생물의 활성을 회복하기 위해 50 mL TSB/R2A 배지를 포함한 250 mL 삼각플라스크를 이용하여 28°C, 160 rpm에서 1-2일 동안 배양한 후 각각의 배양액의 3-5%(v/v)를 1 L 배지가 포함된 2.5 L 삼각플라스크에 접종하였다. 최적으로 향생물질 생성하기 위해 28°C, 170 rpm에서 5-7일간 배양을 수행하였다.

나. 향균물질의 추출

최종 배양액에서 박테리아 세포들을 제거하기 위해 4°C, 8000 rpm에서 20분간 원심분리를 진행하였다. 세포를 제거한 상등액을 확보한 후 각각의 용매 ethyl acetate, diethyl ether, n-Butanol 등을 이용하여 상등액과 동일한 부피로 두 번에 걸쳐서 상등액내의 용질을 추출하였다. 추출된 용액은 rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 기화시켰다.

다. 향균물질의 분리

향균물질의 분리를 위해 일단 TLC plate를 이용하여 대략적으로 분리하여 향균활성을 조사하였고 실리카겔 컬럼을 이용하여 1차로 분리한 후 HPLC를 이용하여 최종적으로 분리하여 분리된 각각의 화합물들의 향균능을 조사하였다. 실리카겔 컬럼과 HPLC에 관련된 정보는 Table 8-9에 기술하였다.

Table 8-9. Setup conditions of Silica Gel Column and HPLC

Silica Gel Separation <ul style="list-style-type: none">- Glass column: 13x150 mm- Silica gel: Dowex[®]MAC-3hydrogenform/Sephadex LH-20 (Sigma aldrich)- Elution solvent system: Chloroform/Methanol/Hexane/Acetone.
HPLC Purification <ul style="list-style-type: none">- HPLC system (model no. CHM0003)- Column: 19x250 mm (XBridge[™]prepC1810μmOBD[™],Ireland)- HPLC running conditions:<ul style="list-style-type: none">Solvent A: 0.1% Trifluoroacetic acid /H₂OSolvent B: 0.1% Trifluoroacetic acid /acetonitrileGradient: 10 - 50% B/100 min and 50 - 80% B/10 min.Flow rate: 1.0 mL/minDetector: UV at 210, 214, 230, 254, 280 nm

6. 분리된 신종균주의 분류학적 특성 분석

가. 균주의 동정

(1) 균주의 형태학적 특징 (Morphological characteristic)

분리된 균주는 H. C. J. 그람(1853~1938)이 고안한 특수 염색법인 그람 염색(Gram Staining)으로 그람 양성/음성 여부와 단일 균주 유무를 확인했다. 실험은 Fig. 5와 같이 진행하였으며 관찰에는

광학현미경을 이용했으며 관찰 배율은 1000x 이었다.

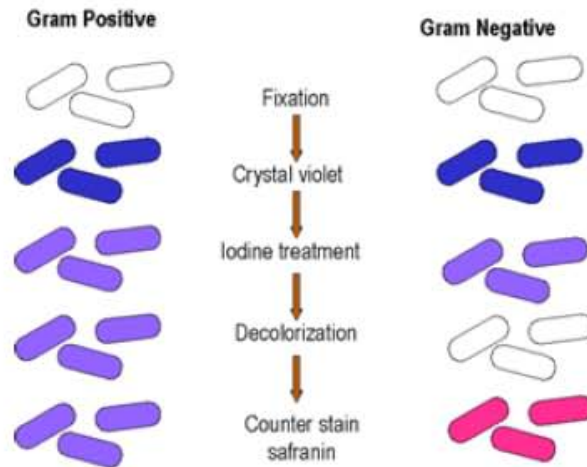


Figure 8-5. Gram Staining methods to confirm Gram+ or Gram - of a single strain

(2) DNA 염기서열 분석

순수 분리된 균주들은 1차 배양에 사용된 유기배지(표 1.)에 1.5% Agar를 첨가하여 제작된 Agar plate로 2차 순수 배양한 후 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 확인된 Similarity 값을 기준으로 유무를 판별하였다. 염기서열 분석은 (주)macrogen에 의뢰를 통하여 분석하였으며, 최상위 유사균주와의 유사도가 97% 이하인 균은 가능성이 매우 높다고 판단하고 가능성이 있는 균주 중 실험 균을 선택하여 상위 유사균주 20개의 서열을 이용, Bio-edit와 MEGA5로 Phylogenetic tree를 만들었다(Fig. 8-6).

Query (Click to view details)	Length (bp)	Closest match	Similarity (%)
>NA10667-C277F1 1,425p -> Bacillus	1,425	Bacillus megaterium DSM 13418(T)	97.19
o o o	1,402	Moraxella maitensis 35165-1(T)	98.27
l = 9 0 1 0 e e	1,402	Moraxella maitensis 35165-1(T)	98.27
kyo	1,402	Hit sequence has been removed. Click to re-idx.	100.00
lza b	1,363	Neorhizobium capsulatum GSPU11526(T)	98.75
l-2	1,497	Gordonia choelesterivorans Chof-3(T)	99.53
l	1,468	Nitrobacter alkalicus AN1(T) [E]	98.60
ll	1,427	Gordonia choelesterivorans Chof-3(T)	98.78
l	1,426	Dalkholderia pyrrocina JMG 14191(T) [E]	99.15
T382_contig_1	1,467	Serratia nematodiphila D20030861(T)	99.88
ar1-4-1	1,377	Endrobacter asburiae JCM 6051(T)	99.85
Wm2-5-2	1,341	Bacillus aryabhata BRW22(T)	100.00
NB9_contig_1	1,490	Lysinibacillus sphaericus C3-41	100.00
SE3_contig_1	1,467	Erwinia iberica NRRL NRS-1208(T)	99.71
ar1-2-1-1	1,398	Bacillus amyloquelificans subsp. plantarum F2942(T)	99.51

Figure 8-6. Finding of similarity values by using Macrogen analysis data

나. 분리 실험균주의 최적 배양조건 도출

선별한 선택 균주에 대해 다양한 환경조건을 제시하여 최적 배양 조건을 도출했다.

(1) 최적 영양조성 측정 Method

선택 균주를 R2A Agar, MacConkey Agar, TSB Agar, LB Agar, NB Agar (Table 10)를 121℃에 15분간 멸균 하여 제작한 고체 배지에 도말하여 31℃ incubator에 넣어 1~5일간 균주 활성 유무를 확인 했다.

Table 8-10. Chemical composition of tested media for optimal growth

Ingredient	Amount (g) per 1 L DW				
	TSB	LB	NB	R2A	MacConkey
Acid Digest of Casein				0.5	
D(+)-Glucose			1.0	0.5	
Dipotassium Phosphate hydrolysate		10.0		0.3	
Yeast extract		5.0	3.0	0.5	
Magnesium Sulphate				0.24	17
Peptone			15.0		3
Proteose peptone				0.5	
Papaic Digest of soybean	5.0				
Pancreatic Digest of Casein	15.0				
Sodium chloride	5.0	10.0	6.0		5
Sodium Pyruvate				0.3	
Lactose					10
Bile salts					1.5
Neutral red					0.03

(2) 최적 활성 온도 측정 Method

최적 활성 온도는 가장 빠르게 균주가 활성되는 온도를 확인하는 Method로 선택 균주를 10℃, 25℃, 30℃, 37℃, 40℃, 42℃, 52℃로 설정된 incubator에 배양하여 1~5일 동안 균주 활성 유무를 관찰했다. 온도 이외의 조건은 균농도 0.1 g/L, 기질농도 100 mg/L, pH 7 조건으로 실험을 실행했다.

(3) 적정 NaCl 농도 측정 Method

적정 NaCl 농도는 선택균주의 NaCl의 내성 정도를 확인하는 Method로 NaCl 농도를 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%,로 제시하고 이 각각의 NaCl 농도에 대하여 1~5일 동안 균주 활성 유무를 관찰했다. 온도 변화 이외의 조건은 균농도 0.1 g/L, 기질농도 100mg/L, pH 7 조건으로 31℃ Shaking incubator에 실험을 실행했다.

(4) 적정 pH 측정 Method

적정 pH 측정은 선택균주의 최적 활성 pH를 확인하는 Method로 유기 배지 중 R2A 배지(Table 10)를 선택 한 후 NaOH (1M, 5M), HCl(1M, 5M) 용액과 pH 미터기를 사용하여 pH를 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12로 배지를 제작하고 각각의 배지에 균을 접종 한 후 1~5일 동안 균주 활성 유무를 관찰했다. 온도 변화 이외의 조건은 균농도 0.1 g/L, 기질농도 100 mg/L 조건으로 31℃ Shaking incubator에 실험을 실행했다.

(5) 균주의 혐기성-호기성 test Method

혐기성이란 성장 조건 중 O₂와 접촉 시 균주의 활성 및 생장이 저해되는 성질을 말하며, 호기성이란 성장 조건 중 O₂와 접촉 시에도 활성 및 성장에 큰 영향을 주지 않거나 도움을 주며 O₂와 접촉 하지 못할 경우 활성 및 생장이 저해되는 성질을 말한다. 본 Test Method는 유리관을 이용하여 내부에 고체 배지를 채운 후 접종한 후 30초간 Vortex하여 균주를 균일하게 퍼지게 한 후 31℃ Incubator에 배양하여 유리관 아래쪽에서 미생물이 활성화가 된다면 혐기성으로 위쪽에서 활성화가 된다면 호기성으로 판정하였다(Fig. 8-7).

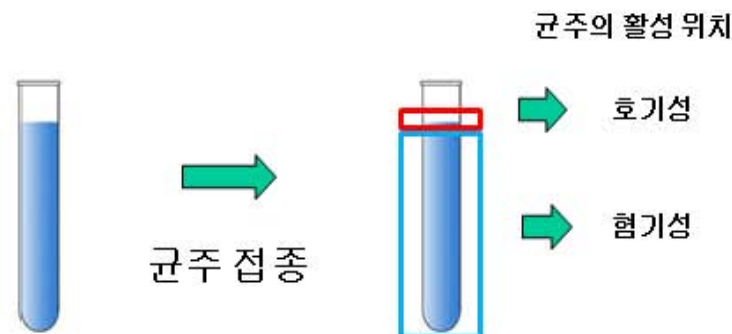


Figure 8-7. Test method of aerobic and anaerobic growth.

다. 생리-생화학적 특징 (Physiological characteristic)

(1) Colony의 형태 비교

균주 간 비교를 위하여 사용되는 방법으로 동일한 조건 내에서 동일하게 배양한 균주 간 단일 콜로니의 크기와 형태적인 특징을 비교하는 방법으로서 본 연구에서 37℃ incubator에서 2일간 배양 후 크기와 형태적인 특징을 비교하였다.

(2) API kit test

선발된 균주의 생화학적 분류, 동정을 위해 상업적으로 생산되는 API 20NE(Fig. 8-8), ID 32GN, API ZYM kit를 이용하였다. 고체배지에 시험균을 streaking하여 31℃ incubator에 1일 간 배양 한 후 단일 Colony를 loop를 이용하여 0.85% NaCl 40 mL에 현탁하여 각 키트 plate에 제공된 매뉴얼에 따라 반응시킨 후 확인 하였으며 apiweb™ database (<http://www.apiweb.biomerieux.com>)를 이용하여 database를 분석 하였다.



Figure 8-8. API 20NE kit

(3) Catalase Test

대부분의 세균이 생성하는 Catalase는 실제 필요량 보다 과량이기 때문에 과산화수소와 결합시 산소의 발생을 보인다. Catalase Test는 이러한 반응을 이용하는 실험으로 포도상 구균에서 연쇄상구균을 감별하거나 그람 퍼지티브 간균과 Mybacterium을 감별하는데 사용되는 실험방법으로 연쇄상균을 제외한 대부분의 호기성 세균과 통성 혐기성 세균은 Catalase Activity를 가지고 있다. 본 실험에서는 고체배지에서 배양된 균을 유리판 위에 놓고 3.0% 과산화수소 용액을 부어서 기포의 발생유무를 통하여 균을 판정했다(Figure 8-9).

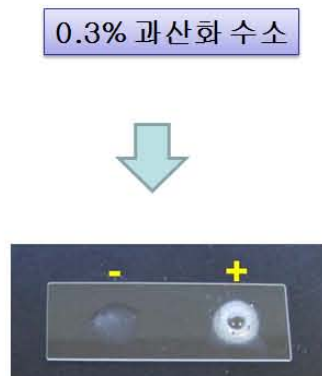


Figure 8-9. Catalase Test methods

(4) Polar lipids TLC

극성 지질 검사법으로 미생물의 구성 성분 중 지질의 구성 성분을 비교하여 선택 균주와 비교 균주간의 차이를 검사하는 방법이다. 본 방법에는 동결 건조된 미생물이 사용되었으며, TLC (박층크로마토 그래피)를 이용하여 분석하였다(Fig. 8-10).



Figure 8-10. TLC method

(5) 지방산(Fatty acid) 분석

지방산(Fatty acid) 분석은 세포막에 존재하는 균체 지방산이 종에 따라 서로 다르다는 점을 이용하여 선택 균주의 균체 지방산이 유사 균주들의 균체 지방산과 다르다는 것을 증명하기 위한 방법으로 선택 균주와 대조 균주의 균체만을 회수하여 지방산을 추출하고 flame ionization detector (FID)를 장착한 HP 6890N gas chromatograph (Agilent, USA)를 이용하였으며, MIDI사의 SHERLOCK system software를 이용하여 분석하였다(Fig. 8-11).

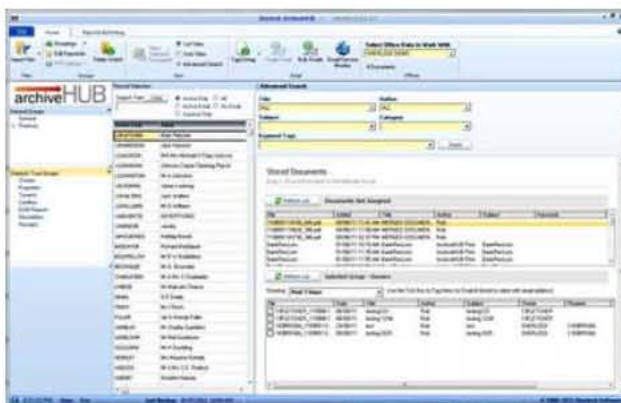


Figure 8-11. MIDI SHERLOCK system software and 6890N gas chromatograph (Agilent, USA)

(6) Quinone 분석

균주의 구성 성분 중 하나인 quinone 골격구조를 이용하여 균을 동정하는 방법으로 균주에 어떠한 종류의 퀴논 계열의 분자가 함유 되어 있는 확인하고 상대적인 비율을 기반으로 균주 간에 동정 및 분류에 사용되는 실험법이다. 미생물에서는 Q-5에서 Q-13까지의 isoprene 단위의 분자종이 미생물의 우점 quinone으로 존재하며, Gram염색이 어려운 세균 및 일반 세균 동정에 많이 이용되며, quinone 골격구조의 차이는 분류학적 의의뿐만 아니라, 미생물의 에너지 대사 양식을 포함한 생리생화학적 의의 및 진화상의 의미 해석에도 중요하다. 본 연구에서는 경기대학교에서 가지고 있는 Method를 기반으로 Polar lipids TLC와 연계하여 시료를 준비하였다. 분석에는 기체 크로마토그래피가 사용되었으며 standard로는 *E. coli*를 사용하였다. 결과 값을 기준으로 적분 분석을 통하여 퀴논 구성물을 확인 하였다.

(7) GC mol %

분자적 레벨에서의 균주 구성물을 확인하는 방법으로 DNA 염기 사슬내에 G와 C의 함유량을 조사하는 방법이다. 시료는 경기대학교에서 가지고 있는 Method를 기초로 DNA isolation을 진행하여 DNA를 추출한 후 Nano drop을 이용하여 DNA의 농도 및 순수도를 확인한 후 전처리를 통하여 시료를 준비 하였다. 분석에는 고속액체 크로마토그래피를 이용하였다.

(8) DNA-DNA Hybridization

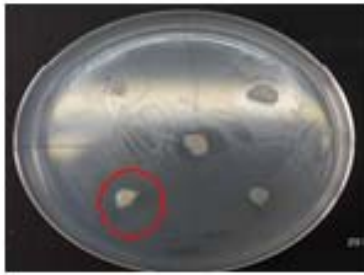
DNA-DNA Hybridization (DDH)는 근연이라고 생각되는 미생물 균주에서 동일종 여부를 확인하기 위해 사용하는 실험법이다.(유사성 97% 이상의 균주 사용) 대표적인 방법으로 두 가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 두 종의 DNA 용액을 동량 혼합하여 hybridization 반응을 통하여 확인하는 방법이 있다. 두 번째 방법은 한 쪽의 DNA 담체를 고정 한 후 용액 속에 Labelling DNA와 Hybridization 반응을 수행하여 확인하는 방법으로 본 연구에서는 이 방법으로 통하여 동일 종 여부를 확인 하였다.

7. 미국부저병균에 대항한 항생균주의 확보

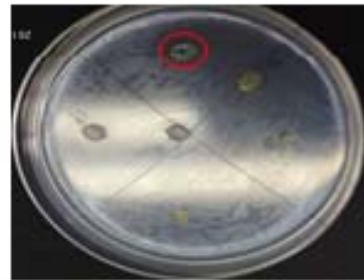
약 2,000개 이상의 방선균 분리균주로부터 항생테스트를 통해 106개의 활성균주를 확보하였다. 이 중 14개의 분리균주는 동정이 아직 되지 않았고 (Table 8-11; Fig.8-12) 나머지 92균주는 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 근연종을 밝히고 10개의 속에 속하는 균주들임을 확인했으며 그들의 활성정도를 억제환의 지름을 통해 표기하였고 유사도가 98% 이하로 신종 가능성이 매우 큰 6균주는 회색으로 하이라이트로 했고 신물질 가능성이 높다 (Table 8-12 & Fig. 8-13).

Table 8-11. List of unidentified strains having antibacterial activity

Sampling Site	Strain	Inhibition Zone (mm)
시흥 소래산4	C	13.1
순창 3	14	2.9
순창 3	7	16.6
순창 5	5	8
광교산3	33	6.7
광교산3	34	5.3
광교산1	8	8.37
광교산1	7	8.3
순창1	22	15.14
순창1	4	36.9
광교산3	12	7.1
순창2	8	9
순창2	10	10.9
과천1	D-3	10.2



경기도 시흥시 소래산 마애상 불상 옆 (C)



전라북도 순창군 유등면 마포두부 (14)

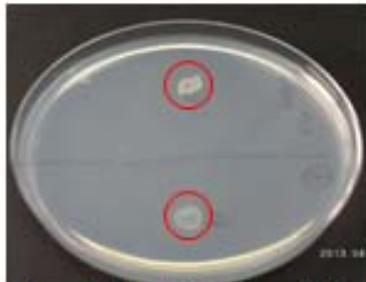


전라북도 순창군 유등면 마포두부 (7)

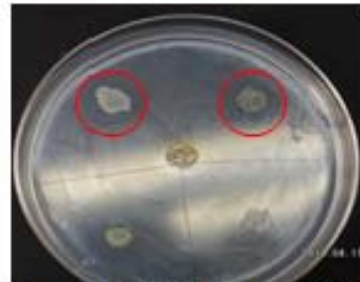


전라북도 순창군 동은면 대석 아파트 (5)

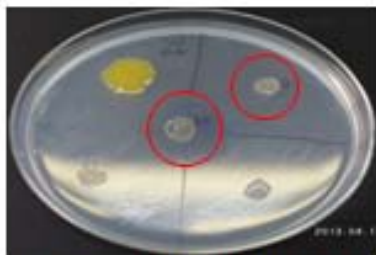
KGU 경기대학교



경기도 수원시 이의동 광고산 입구 (33&34)



경기도 수원시 이의동 광고산 중턱 (8&7)



전라북도 순창군 팔덕면 감천산 입구 (22&4)



경기도 수원시 이의동 광고산 입구 (12)

KGU 경기대학교

Figure 8-12. Actinobacteria showing antibacterial activity against *Paenibacillus larvae* by spot method (unidentified)



Figure 8-12 (continued).

Table 8-12. List of actinobacterial and other bacterial isolates from soil showing antibacterial activity

Strain	Closest species	PS ¹⁾ (%)	DIZ ²⁾ (mm)	Strain	Closest species	PS (%)	DIZ (mm)
T20	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	100	13.1	T113	<i>Streptomyces caeruleatus</i>	98.64	17
T94	<i>Streptomyces rishiriensis</i>	99.79	16.6	T118	<i>Streptomyces cockleensis</i>	98.61	20
T8	<i>Streptomyces ferrugineus</i>	98.94	8.3	T120	<i>Streptomyces tanashiensis</i>	99.58	30
T10	<i>Kitasatospora kōfunensis</i>	99.79	36.9	T121	<i>Streptomyces caeruleatus</i>	97.9	15
T12	<i>Streptomyces alni</i>	97.8	9	T122	<i>Streptomyces purpeofuscus</i>	99.37	16
T13	<i>Streptomyces gramineus</i>	98.29	10.9	T247	<i>Streptomyces rubidus</i>	98.44	12.5
T19	<i>Streptomyces setonii</i>	100	10.2	T248	<i>Streptomyces tanashiensis</i>	99.58	16.5
T30	<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp.	99.93	7.5	T250	<i>Streptomyces resistomycificus</i>	99.02	22

	<i>ossamyceticus</i>						
T37	<i>Streptomyces anulatus</i>	99.93	10.5	T252	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	99.24	7
T38	<i>Streptomyces xanthocidicus</i>	99.93	20.5	T258	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	98.76	7.5
T40	<i>Streptomyces mirabilis</i>	98.73	9	T261	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	99.86	7
T116	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i>	100	4.5	T263	<i>Streptomyces spororaveus</i>	99.86	8.5
T42	<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	99.93	6	T269	<i>Streptomyces flavotricini</i>	99.79	9
T43	<i>Streptomyces bottropensis</i>	100	6.5	T271	<i>Streptomyces lateritius</i>	99.72	24
T54	<i>Streptomyces canus</i>	99.93	5	T274	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	99.93	18.5
T99	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	99.86	6.5	T276	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	99.23	25
T46	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	99.09	4	T277	<i>Streptomyces galbus</i>	99.93	8.5
T107	<i>Streptomyces virginiae</i>	99.65	6	T279	<i>Streptomyces cirratus</i>	99.79	9
T93	<i>Streptomyces ederensis</i>	99.93	7	T280	<i>Streptomyces angustmycinicus</i>	99.93	10
T49	<i>Streptomyces misakiensis</i>	99.44	4.5	T289	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	99.93	10.5
T62	<i>Streptomyces humidus</i>	98.54	5	T291	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	98.83	9.5
T72	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	99.37	6.5	T293	<i>Streptomyces sanglieri</i>	99.72	7.5
T56	<i>Streptomyces yanglinensis</i>	97.94	34	T301	<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	99.31	12.5
T57	<i>Streptomyces corchorusii</i>	99.38	15	T305	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>	99.72	6
T58	<i>Streptomyces caniferus</i>	99.93	12.5	T309	<i>Streptomyces racemochromogenes</i>	99.66	25
T91	<i>Streptomyces chartreusis</i>	99.24	25	T313	<i>Streptomyces nigrescens</i>	99.93	4
T60	<i>Streptomyces lannensis</i>	99.38	22.5	T321	<i>Streptomyces longisporoflavus</i>	99.57	4.5
T73	<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i>	99.51	22.5	T325	<i>Streptomyces mirabilis</i>	98.89	34
T64	<i>Streptomyces sporoverrucosus</i>	99.86	8.5	T326	<i>Streptomyces canarius</i>	99.51	15
T65	<i>Streptomyces bungoensis</i>	99.65	6.5	T327	<i>Streptomyces glebosus</i>	99.42	16.5
T66	<i>Streptomyces violaceus</i>	98.61	4	T330	<i>Streptomyces niveus</i>	99.45	6
T67	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i>	99.86	20	T21	<i>Pseudomonas moorei</i>	98.75	10
T105	<i>Streptomyces</i>	99.44	12.5	T2	<i>Bacillus marisflavi</i>	99.13	2.9

	<i>aureus</i>						
T69	<i>Streptomyces misakiensis</i>	99.37	17	T31	<i>Bacillus aryabhatai</i>	99.45	24
T70	<i>Streptomyces prunicolor</i>	99.45	9.5	T6	<i>Bacillus anthracis</i>	99.46	5.3
T112	<i>Streptomyces zaomyceticus</i>	100	6.5	T32	<i>Massilia suwonensis</i>	97.73	12.5
T79	<i>Streptomyces cacaoi</i> subsp. <i>asoensis</i>	99.86	7	T33	<i>Massilia niastensis</i>	98.06	12
T81	<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	100	4.5	T36	<i>Chitinophaga eiseniae</i>	96.17	7
T82	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	98.9	6	T102	<i>Kitasatospora arboriphila</i>	99.86	7.5
T88	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	99.65	8.5	T260	<i>Actinomadura coerulea</i>	99.5	7.5
T89	<i>Streptomyces ederensis</i>	98.6	7	T296	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i>	99.3	7
T90	<i>Amycolatopsis decaplanina</i>	99.65	4	T297	<i>Actinoplanes palleronii</i>	98.17	6.5
T96	<i>Streptomyces neopeptinius</i>	98.93	11.5	T333	<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i>	99.72	13.5
T104	<i>Streptomyces bobili</i>	98.96	7.5	T401	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	99.31	8
T108	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	98.69	22.5	T334	<i>Actinomadura mexicana</i>	99.86	12.5
T110	<i>Streptomyces albosporeus</i> subsp. <i>labilomyceticus</i>	97.95	18.5	T117	<i>Streptomyces angustmycinicus</i>	99.72	26.5

¹⁾ abbreviation of "pairwise similarity"

²⁾ abbreviation of "diameter of inhibition zone"

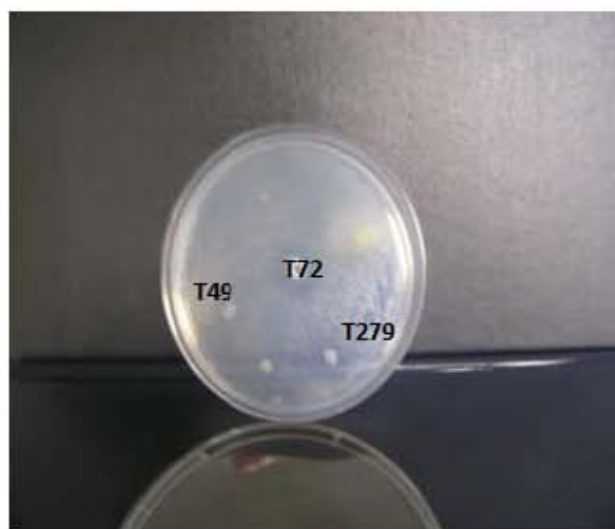
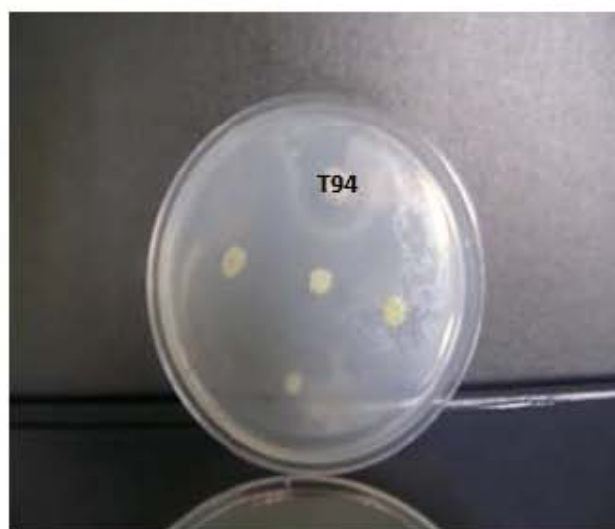


Figure 8-13. Actinobacteria showing antibacterial activity against *Paenibacillus larvae* by spot method

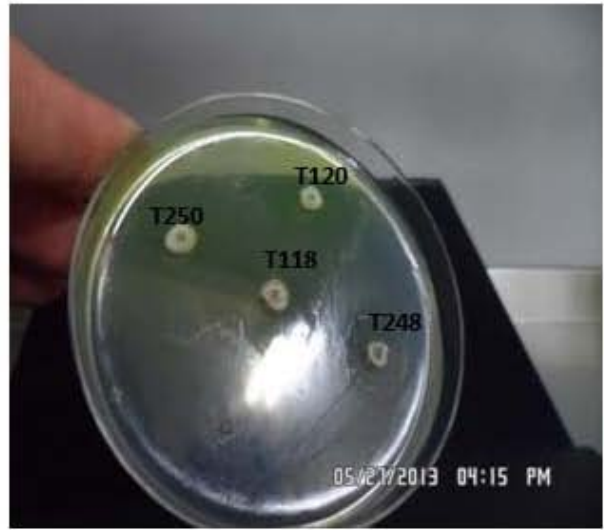


Figure 8-13 (continued).



Figure 8-13 (continued).



Figure 8-13 (continued).



Figure 8-13 (continued).

8. 분리균주의 균집분석 및 신종 가능성 분석

한국의 다양한 표토의 토양시료에서 분리한 방선균 중 미국부저병 균에 항생효과가 있는 균주를 대상으로 균집구조를 속 수준에서 분석하고 신종가능성별로 분석한 결과 92개 균주 중 방선균이 85개였고 비방선균이 7개로 조사되었다. 방선균(Actinobacteria) 중에는 *Streptomyces* 속에 속하는 균주가 76개로 가장 많았고 그 다음이 *Actinomadura* 속의 균주로 3개, *Kitasatospora* 속의 균주가 2개 그리고 *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Pseudosporangium* 속에 속하는 균주가 각각 1개씩으로 동정되었다(Table 13 & Fig. 14). 한편 신종 가능성 항생균을 조사해 본 결과, 16S rDNA 염기서열 유사도가 97%이하로 통계상 신종가능성이 100%인 균주가 1개, 유사도가 97-98%사이로 신종가능성이 80%-90%인 경우가 5개, 유사도가 98%-99%사이고 신종가능성이 70%-80%인 경우가 19개, 유사도가 99%이상으로 신종가능성이 50%이하인 경우가 67개로 나타났다(Table 14 & Fig. 15). 결국 약 27% 정도가 신종일 가능성이 70%이상으로 매우 높고 신종으로 밝혀지면 기존의 항생물질이 아닌 새로운 항생물질일 가능성이 높아 앞으로 화학물질 분석을 통해 새로운 항생제 개발에 기여할 것으로 기대된다.

Table 8-13. Community structure analysis of isolates having antibacterial activity against *P. larvae*

Phylum	Genus	No
Actinobacteria	<i>Streptomyces</i>	76
Actinobacteria	<i>Actinomadura</i>	3
Actinobacteria	<i>Kitasatospora</i>	2
Actinobacteria	<i>Actinoplanes</i>	1
Actinobacteria	<i>Amycolatopsis</i>	1
Actinobacteria	<i>Micromonospora</i>	1
Actinobacteria	<i>Pseudosporangium</i>	1
Proteobacteria	<i>Massilia</i>	2
Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	1
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	3
Bacteroidetes	<i>Chitinophaga</i>	1

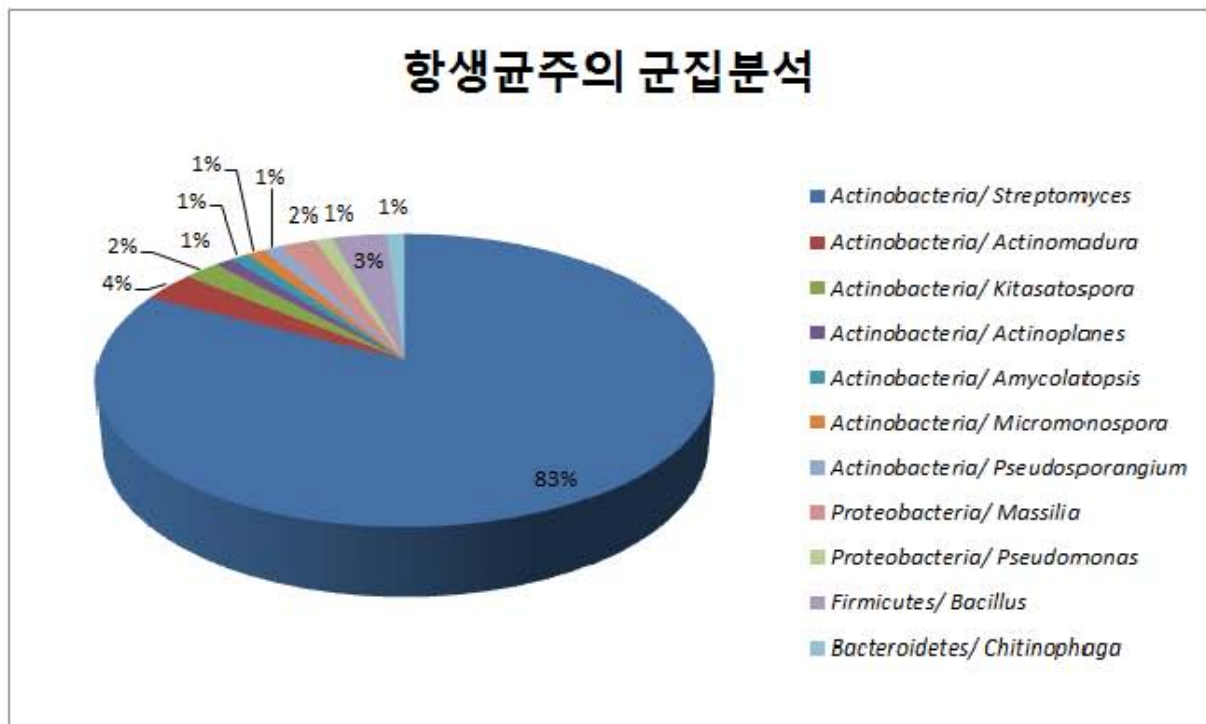


Figure 8-14. Distribution of genera of antibacterial isolates in Actinobacteria and other phyla

Table 8-14. Number of possible new species among 92 isolates having antibacterial activity

신종가능성	16S rDNA 염기서열 유사도	No
100%	97%	1
80-90%	97-98%	5
70-80%	98-99%	19
50% 이하	99% 이상	67

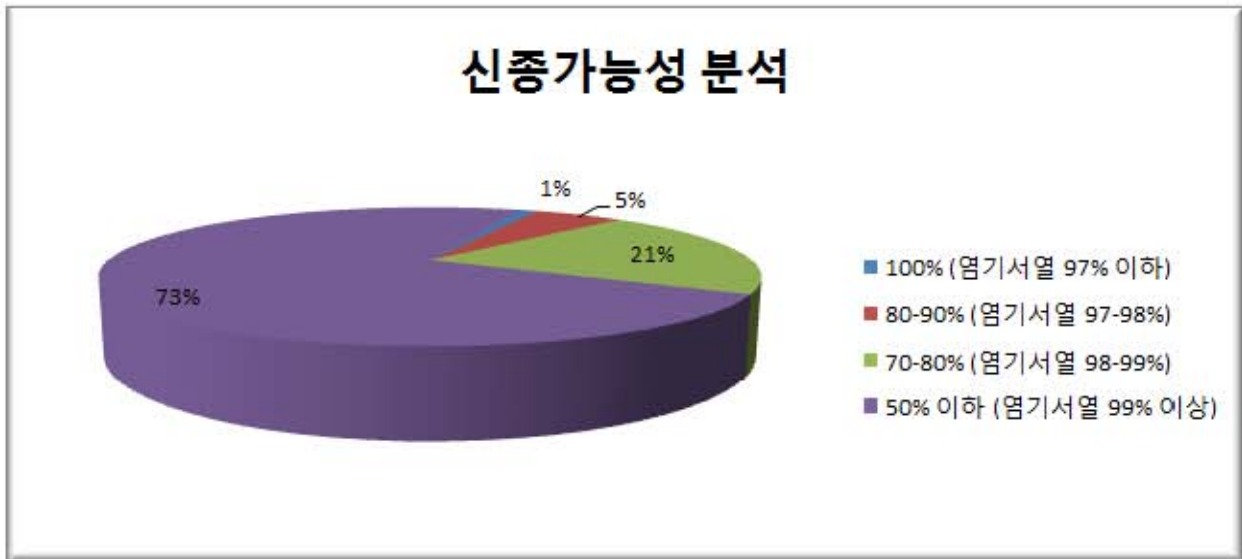


Figure 8-15. Possibility of new species in anti-bacterially active isolates

9. 미국부제병 균주를 이용한 일반 병원성균들의 항생/항진균성 조사

1차년도에 약 2,000개 이상의 방선균 분리균주로부터 항생테스트를 통해 106개의 활성균주를 확보하였다. rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 근연종을 밝혔는데 10개의 속어 속하는 균주들임을 확인했으며 일반 병원성균들을 대상으로 활성정도를 억제환의 지름을 통해 표기하였다(Table 8-15; Fig. 8-16). 병원성 세균인 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, 진균인 *Candida albicans*, *Aspergillus niger* 등을 사용하여 항균능을 조사하고 있다. 테스트균주로 사용된 균주의 목록은 Table 16에 나와 있다. 결과적으로 모든 일반 병원성균에 항미생물 효과가 있었다. 특히 *P. aeruginosa*를 제외한 모든 균에서 10mm 이상의 억제환을 발견하였다.

Table 8-15. List of test pathogens

Test pathogens	Collection number
<i>Bacillus subtilis</i>	KEMB 51201-001
<i>Staphylococcus aureus</i>	KEMB 4-659
<i>Escherichia coli</i>	KEMB 212-234
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KACC10185
<i>Candida albicans</i>	KACC 30003
<i>Aspergillus niger</i>	KACC 40280

Table 8-16. Antimicrobial activity of actinobacterial and other bacterial isolates

Strain	Closest cultivated species (Genbank accession no.)	Pairwise Similarity(%)	<i>P. larvae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. aeruginosa</i>
			Diameter (mm)						
T44	<i>Streptomyces canus</i> NRRL B-1989(T)/AY999775	99.93	5	-	5	-	-	-	-
T270	<i>Streptomyces flavotricini</i> NBRC12770(T)/AB184132	99.79	9	-	3	-	-	-	1
T280	<i>Streptomyces angustmycinicus</i> NBRC 3934(T)/AB184817	99.93	10	-	3	-	-	-	-
T122	<i>Streptomyces purpeofuscus</i> NBRC 12905(T)/AB184234	99.37	16	4	1	-	-	1	-
T120	<i>Streptomyces tanashiensis</i> LMG 20274(T)/AJ781362	99.58	30	3	1	-	-	-	-
T55	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> LMG 19941(T)/AJ781339	99.37	6.5	-	1	-	-	-	-
T326	<i>Streptomyces canarius</i> NBRC 13431(T)/AB184396	99.51	15	-	2	-	-	-	-
T305	<i>Streptomyces cinnamomensis</i> NBRC 15873(T)/AB184707	99.72	6	7	5	-	-	-	-
T31	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22(T)/EF114313	99.45	24	-	1	-	-	-	-
T64	<i>Streptomyces sporoverrucosus</i> NBRC 15458(T)/AB184684	99.86	8.5	16	4	-	5	15	-
T313	<i>Streptomyces nigrescens</i> NBRC 12894(T)/AB184225	99.93	4	2	1	-	-	-	1
T263	<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313(T)/AJ781370	99.86	8.5	-	1	-	-	2	-
T252	<i>Streptomyces mauvecolor</i> LMG 20100(T)/AJ781358	99.24	7	1	5	2	-	5	-
VN93	<i>Streptomyces racemochromogenes</i>	99.32	20	3	2	-	-	-	-
T48	<i>Streptomyces ederensis</i> NBRC 15410(T)/AB184658	99.93	7	-	5	-	-	-	-
T60	<i>Streptomyces lannensis</i>	99.38	22.5	9	3	-	-	-	-

	TA4-8(T)/AB562508								
T82	<i>Streptomyces mauvecolor</i> LMG 20100(T)/AJ781358	98.9	6	1	5	1	3	8	-
T65	<i>Streptomyces bungoensis</i> NBRC 15711(T)/AB184696	99.65	6.5	1	2	-	-	-	-
T88	<i>Streptomyces exfoliatus</i> NBRC 13191(T)/AB184324	99.65	8.5	-	1	1	-	1	-
T45	<i>Streptomyces cinnamomensis</i> NBRC 15873(T)/AB184707	99.86	6.5	-	5	-	-	-	-
T3	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NBRC 13407(T)/AB184383	99.79	16.6	1	-	-	-	2	-
T69	<i>Streptomyces misakiensis</i> NBRC 12891(T)/AB184223	99.44	17	2	-	-	-	1	-
T261	<i>Streptomyces longwoodensis</i> LMG 20096(T)/AJ781356	99.86	7	-	-	-	-	1	-
T68	<i>Streptomyces aureus</i> NBRC 100912(T)/AB249976	99.44	12.5	-	-	-	-	5	-
T58	<i>Streptomyces caniferus</i> NBRC 15389(T)/AB184640	99.93	12.5	-	-	-	-	2	-
T274	<i>Streptomyces luteogriseus</i> NBRC 13402(T)/AB184379	99.93	18.5	-	-	1	-	2	1
T327	<i>Streptomyces glebosus</i> CGMCC4.1873(T)/H Q244456	99.42	16.5	1	-	-	-	1	-
T289	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> LMG 19941(T)/AJ781339	99.93	10.5	1	-	-	-	1	-
T277	<i>Streptomyces galbus</i> DSM 40089(T)/X79852	99.93	8.5	-	-	-	-	2	-
T8	<i>Streptomyces ferralitis</i> SFOp68(T)/AY26282 6	98.94	8.3	15	-	-	-	2	-
T91	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753(T)/AB184839	99.38	25	-	-	-	-	1	-
T293	<i>Streptomyces sanglieri</i> NBRC 100784(T)/AB249945	99.72	7.5	2	-	-	-	3	-
T47	<i>Streptomyces virginiae</i> NBRC 12827(T)/AB184175	99.65	6	4	-	-	-	-	1
T280	<i>Streptomyces angustmycinicus</i>	99.93	10	2	-	-	-	-	-

	NBRC 3934(T)/AB184817								
T16	Streptomyces setonii NBRC 13085(T)/AB184300	100	10.2	2	-	1	-	-	-
T1	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)/AY999894	100	13.1	1	-	-	-	-	-
T271	Streptomyces lateritius LMG 19372(T)/AJ781326	99.72	24	7	-	-	-	-	-
T89	Streptomyces ederensis NBRC 15410(T)/AB184658	98.6	7	3	-	-	-	-	1
T326	Streptomyces canarius NBRC 13431(T)/AB 184396	99.51	15	3	-	-	-	-	-
T49	Streptomyces misakiensis NBRC 12891(T)/AB184223	99.44	4.5	5	-	-	-	-	-
T121	Streptomyces caeruleatus GIMN4(T)/GQ329712	<u>97.9</u>	15	1	-	-	-	-	-
T260	Actinomadura coerulea IFO 14679/U49002	99.5	7.5	8	-	-	-	-	-
T63	Streptomyces rubiginosohelvolus IFO 12912(T)/AY999864	99.51	22.5	1	-	-	-	-	1
T261	Streptomyces longwoodensis LMG 20096(T)/AJ781356	99.86	7	2	-	-	-	-	-
T12	Streptomyces alni D65(T)/DQ460470	<u>97.8</u>	12	1	-	-	-	-	1
T519	Streptomyces ferraltis SFOp68(T)/AY26282 6	99.02	-	10	10	-	11	15	-
T509	Streptomyces yogyakartensis NBRC 100779(T)/AB249942	99.86	-	-	-	-	3	-	-
T511	Pseudomonas xanthomarina KMM 1447(T)/ AB176954	98.9	-	-	-	-	10	-	-
T512	Streptomyces xanthocidicus NBRC 13469(T)/AB184427	99.65	20.5	3	14	-	13	3	-
T501	Nonomuraea jabiensis A4036(T)/HQ157186	99.38	-	-	1	1	-	-	-
T502	Kitasatospora viridis 52108a(T)/AY613990	99.43	-	-	-	2	-	-	-
T505	Paenibacillus peoriae DSM 8320(T)/AJ320494	99.18	-	4	2	5	-	-	2

T515	<i>Bacillus panaciterrae</i> Gsoil 1517(T)/AB245380	96.72	-	15	20	-	-	-	-
T520	<i>Streptacidiphilus anmyonensis</i> AM-11(T)/DQ904546	99.86	-	-	8	-	-	-	-
T528	<i>Promicromonospora umidemergens</i> 09-Be-007(T)/FN293378	99.17	-	3	9	-	-	-	-
T524	<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i> 13-12-50(T)/AB331731	99.52	-	3	8	-	-	-	-
T525	<i>Streptomyces blastmyceticus</i> NRRL B-5480(T)/AY999802	99.18	-	20	20	-	-	15	-
T529	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250(T)/AY999794	100	-	1	-	-	-	1	-
T523	<i>Streptomyces scopuliridis</i> RB72(T)/EF657884	98.75	-	-	-	-	-	5	-
T258	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> ATCC 12309(T)/D63867	98.69	-	4	-	-	-	-	-
T811	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> LMG 19941(T)/AJ781339	100	-	5	5	3	-	-	-
T801	<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313(T)/AJ781370	99.86	-	-	-	3	-	9	-
T804	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430(T)/DQ026656	100	-	-	-	30	-	10	-
T826	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250(T)/AY999794	99.86	-	-	-	2	-	-	-
T827	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> JCM 4364(T)/AY999770	100	-	-	-	3	3	-	-
T806	<i>Streptomyces polychromogenes</i> NBRC 13072(T)/AB184292	100	-	2	-	30	-	12	-
T822	<i>Streptomyces cinnamonensis</i> NBRC 15873(T)/AB184707	99.38	-	2	-	2	5	-	-
T810	<i>Streptomyces narbonensis</i> NBRC 12801(T)/AB184157	99.79	-	14	12	-	-	-	-
T818	<i>Streptomyces cacaoi</i> subsp.	99.93	-	2	5	-	-	-	-

	asoensis NRRL B-16592(T)/ DQ026644								
T812	Streptomyces filamentosus NBRC 12767(T)/AB184130	99.24	-	-	2	-	-	-	-
T815	Streptomyces drozdowiczii NBRC 101007(T)/AB249957	99.58	-	-	3	-	-	-	-
T825	Streptomyces anulatus NRRL B-2000(T)/DQ026637	99.93	-	-	3	-	-	-	-
T805	Streptomyces melanogenes NBRC 12890(T)/AB184222	98.9	-	-	-	-	-	3	-
T808	Streptomyces cinnamomensis NBRC 15873(T)/AB184707	99.45	-	2	-	-	-	2	-
T100 6	Rhodococcus phenolicus DSM 44812(T)/AM933579	98.89	-	-		2	-	-	-
T913	Undibacterium pigrum CCUG 49009(T)/AM397630	98.05	-	2		5	-	-	-
T142 1	Burkholderia dabaoshanensis GIMN1.004(T)/FJ210 816	99.44	-	10	5	-	-	-	-
T912	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)/AY999894	100	-	-	4	-	-	-	-
T150 2	Streptomyces diastatochromogenes ATCC 12309(T)/D63867	98.91	-	-	7	-	-	-	-
T130 1	Kitasatospora kifunensis IFO 15206(T)/AB022874	99.86	-	2	10	-	-	-	-
T151 4	Streptomyces turgidiscabies ATCC 700248(T)/ AB026221	99.05	-	-	3	-	-	-	-
T130 3	Kitasatospora atroaurantiaca NRRL B-24282(T)/DQ02664 5	99.1	-	-	-	-	2	-	-
T130 4	Kitasatospora nipponensis HKI 0315(T)/AY442263	98.99	-	-	-	-	20	3	-
T130 0	Streptomyces violascens NBRC 12920(T)/AB184246	99.1	-	-	-	-	-	2	-
T150 5	Streptomyces antibioticus NBRC 12838(T)/AB184184	100	-	15	-	-	-	-	-
T142 0	Streptomyces longwoodensis LMG	99.72	-	1	-	-	-	-	-

	20096(T)/AJ781356								
T150 6	<i>Streptomyces</i> <i>turgidiscabies</i> ATCC 700248(T)/AB026221	99.1	-	8	-	-	-	-	-
T150 3	<i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i> NBRC 3113(T)/AB184728	99.72	-	-	-	-	-	-	-
A43	<i>Streptomyces</i> <i>anandii</i> NRRL B-3590(T)/ AY999803	99.79	-	4	5	-	6	12	-
A31	<i>Streptomyces</i> <i>rishiriensis</i> NBRC 13407(T)/ AB184383	98.61	-	-	-	-	-	1	-
A33	<i>Amycolatopsis</i> <i>halotolerans</i> N4-6(T)/ DQ000196	98.9	-	-	-	-	-	8	-
A64	<i>Streptomyces</i> <i>resistomycificus</i> NBRC 12814(T)/ AB184166	99.1	-	-	-	-	2	8	-
A14	<i>Streptomyces</i> <i>rubidus</i> 13C15(T)/ AY876941	99.29	-	1	-	-	-	-	-
T184	<i>Streptomyces</i> <i>gramineus</i> JR-43(T)/ HM748598	98.29	-	6	-	-	-	-	-
A19	<i>Streptomyces</i> <i>niveus</i> NRRL 2466(T)/ DQ442532	99.31	-	1	10	-	-	-	-



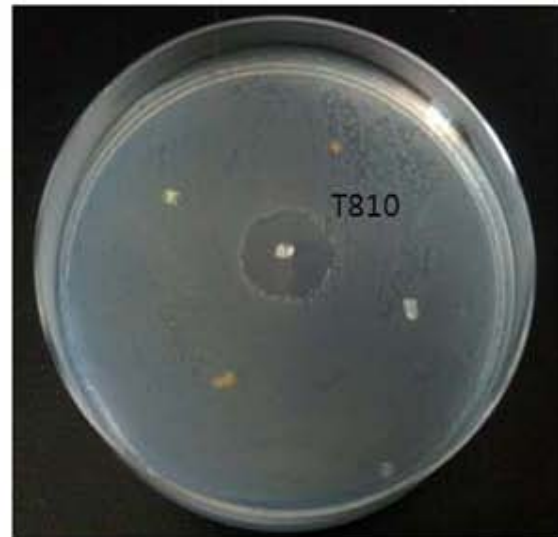
A. niger KACC 40280



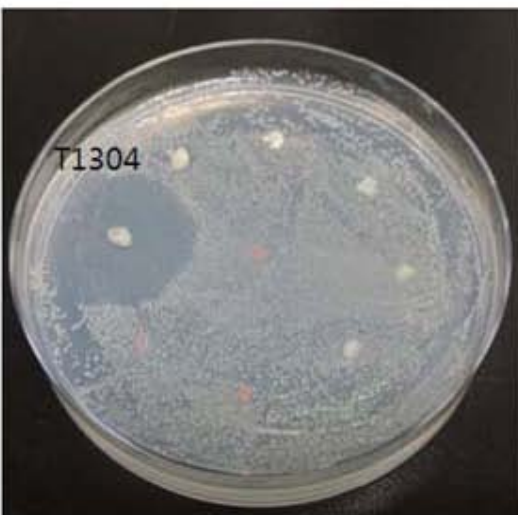
S. aureus KEMB 4659



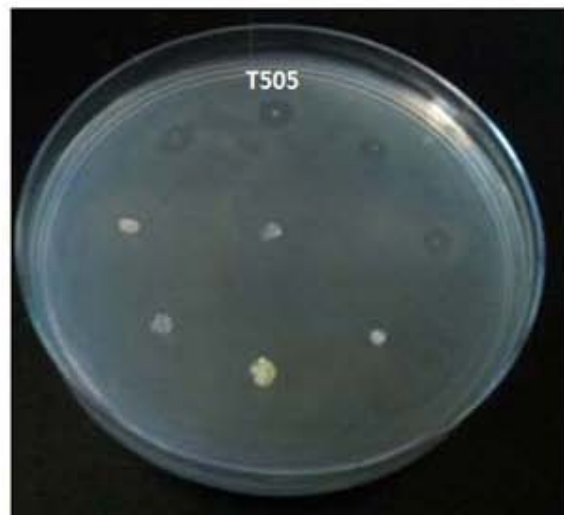
E. coli KEMB 212-234



B. subtilis KEMB 51201-001



C. albicans KACC 30003



P. aeruginosa KACC 10185

Figure 8-16. Actinobacteria and other bacteria showing antibacterial activity against human pathogens by spot method

10. 고효율 방선균의 최적 항생물질 생성 배지 선발

선정된 고효율 방선균이 배지에 따른 항생물질의 생성정도를 측정하기 위해 기존연구에서 검증된 배지를 대상으로 조사를 하였다. 6가지 배지를 선정하였고 배지조성은 Table 17에 나타났다. 고효율균주를 각각 액상배양한 후 10배 농축하여 농축액의 20 μ L를 paper disc를 통해 억제환의 지름을 측정하여 조사하였다(Table 18). 결과적으로 Medium 1은 *Bacillus* sp. T515를 위해 최적이었고 Medium 2는 *Streptomyces* sp. T13, T66, T113, T258, T804를 위해 최적으로 가장 많은 고효율 균주에서 효과가 있었다. 한편 Medium 4는 *Streptomyces* sp. T60, T110에서, Medium 5는 T270에서, 그리고 Medium 6는 T121에서 가장 효과가 있었다.

Table 8-17. Chemical composition of media used for finding effective antibacterial compound-producing conditions for each strain

Component	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5	Medium 6
Nutrient Broth	10 g					
Soybean meal		10 g		10 g	3 g	
Corn steep		5 g		5 g		
Starch		20 g	20 g	10 g		
L-asparagine		0.5 g	0.5 g			
Tryptophane	50 μ g/mL					
Mannitol						20 g
Peptone						20 g
Glucose	10 g			5 g	2.5	
Casein					17 g	
NaCl	2 g	0.5 g	0.5 g		5 g	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	5 mg					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	7.5 mg	1 mg				
MnSO ₄ ·5H ₂ O	3.6 mg					
CaCl ₂ ·2H ₂ O	15 mg					
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9 mg	1 mg				
KNO ₃		1 g	1 g			
K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O		0.5 g	0.5 g		2.5 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.5 g	0.5 g			
MnCl ₂ ·7H ₂ O		1 mg				
CaCO ₃				7 g		
pH	7.2 (NaOH)	7.3	7.5	7.2	7.3	7.3
DW	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L

Table 8-18. Finding optimal medium for producing antibiotics for Actinobacteria and others

Strain	Diameter of inhibition zone (mm)					
	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4	Medium 5	Medium 6
<i>Streptomyces</i> sp. T121	-	-	-	-	-	8
<i>Streptomyces</i> sp. T270	-	-	-	-	16	-
<i>Streptomyces</i> sp. T60	-	18	14	19	9	12
<i>Streptomyces</i> sp. T69	-	-	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T13	-	18	5	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T66	-	26	20	15	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T110	-	-	-	18	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T113	-	25	5	19	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T258	-	15	5	-	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. T804	-	19	18	7	-	-
<i>Bacillus</i> sp. T515	20	-	-	-	-	-

11. 방선균 배양액에서 생리활성물질의 추출 및 항균성 조사

고효율 방선균 배양액에서 생리활성물질을 추출하기 위해 n-hexane, dichloromethane (DCM), ethyl acetate를 사용하여 적합한 용매를 선정하였다. 결과적으로 모든 고효율 균주에서 dichloromethane이 가장 효과가 좋았고 ethyl acetate에서는 일부 균주에서만 미약했고 n-hexane은 전혀 효과가 없었다(Fig 8-17 & 8-19).

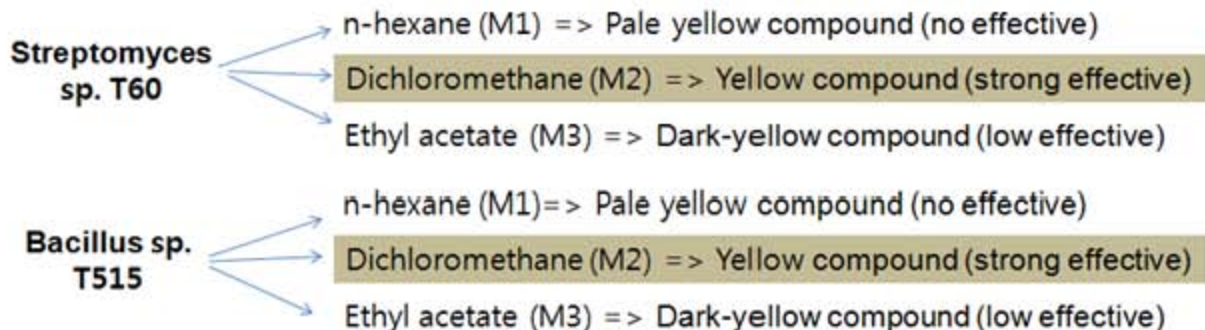
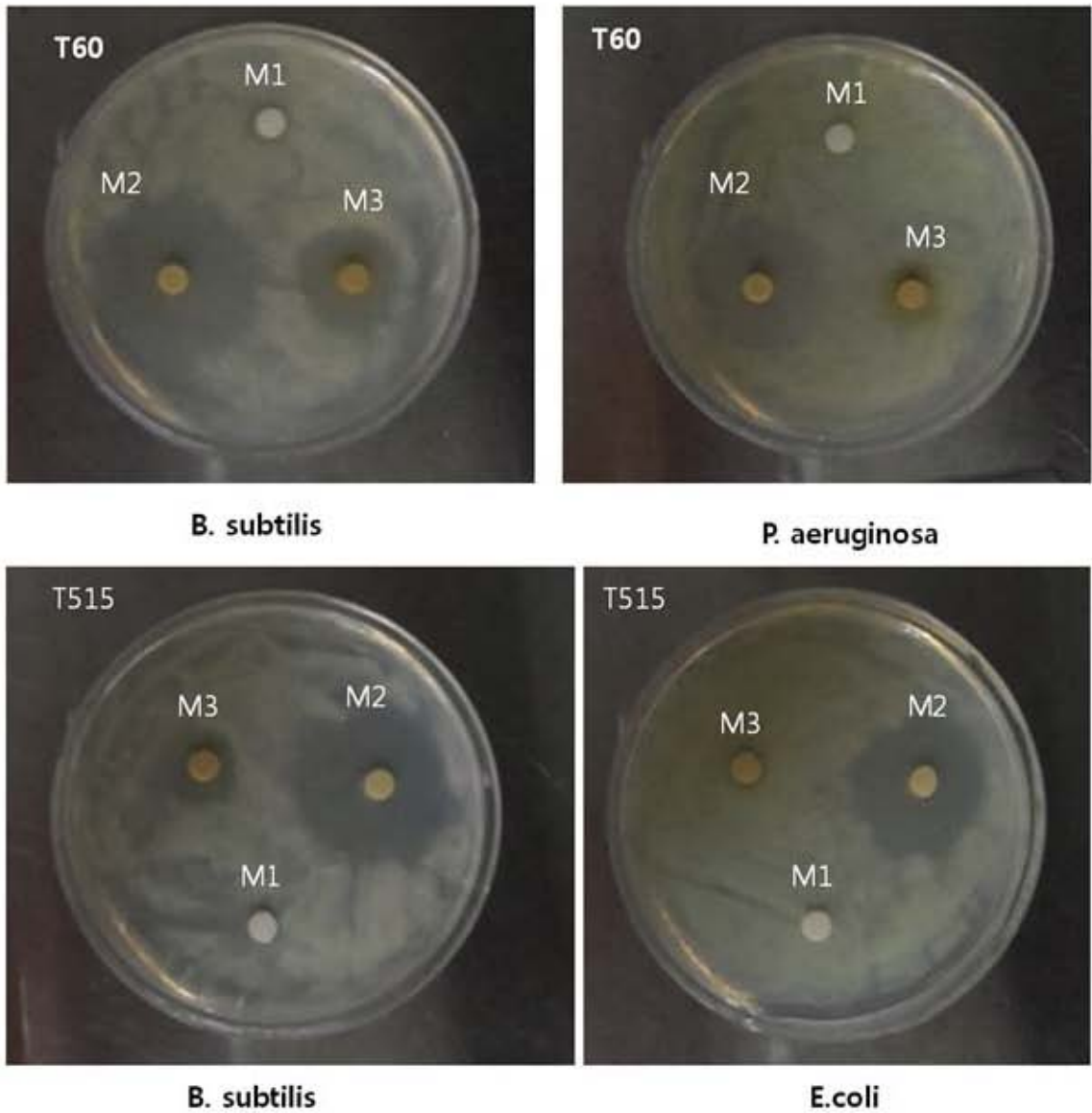


Figure 8-17. Finding of the most effective extracting solvent among three solvents for strains, T60 and T515

그러므로 본 연구에서 분리한 고효율 균주가 생성하는 생리활성물질의 추출을 위해 앞으로도 DCM을 사용하는 것이 가장 적합할 것으로 판단된다. 균주 T60과 T515의 배양액에서 추출한 추출물은 일반 병원성 세균인 *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, 그리고 *E. coli*에 매우 효과가 있었고(Fig. 8-18), T66과 T804의 배양액 추출물은 *S. epidermis*, *S. aureus*, *C. albicans*, *B. subtilis*, *P. karvae* 등 다양한 미생물에 효과가 있었다(Fig. 8-20).



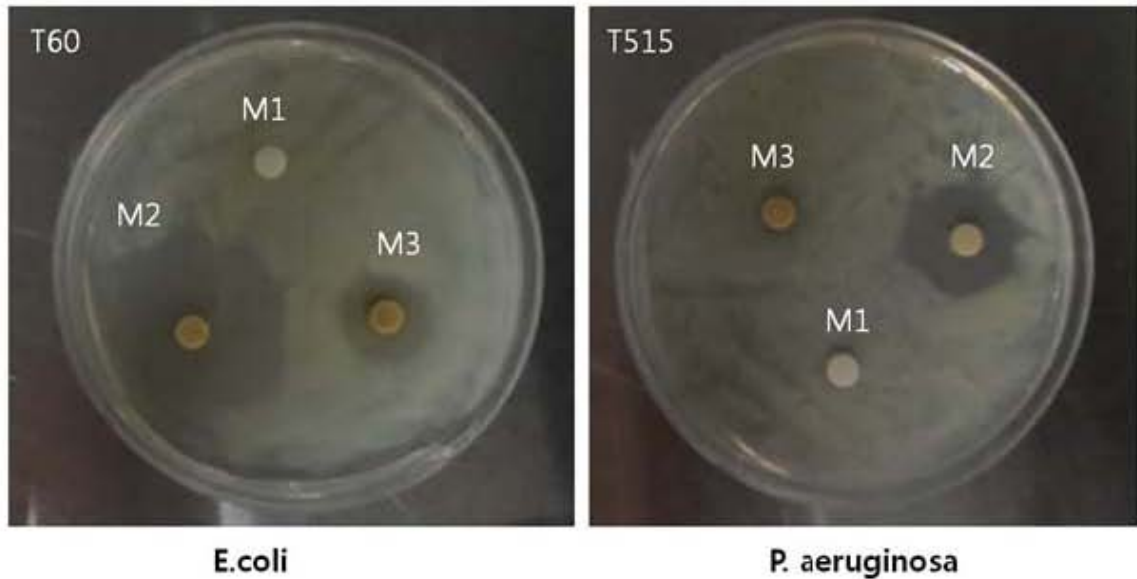


Figure 8-18. Antimicrobial activity of culture extractants from strains T60 and T515 by using the disc assay method

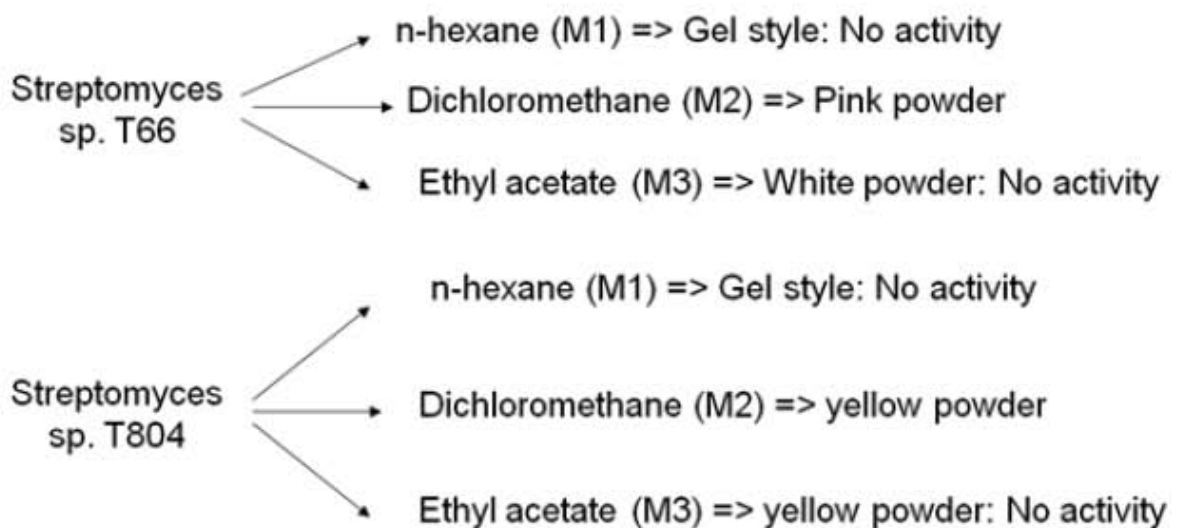


Figure 8-19. Finding of the most effective extracting solvent among three solvents for strains, T66 and T804

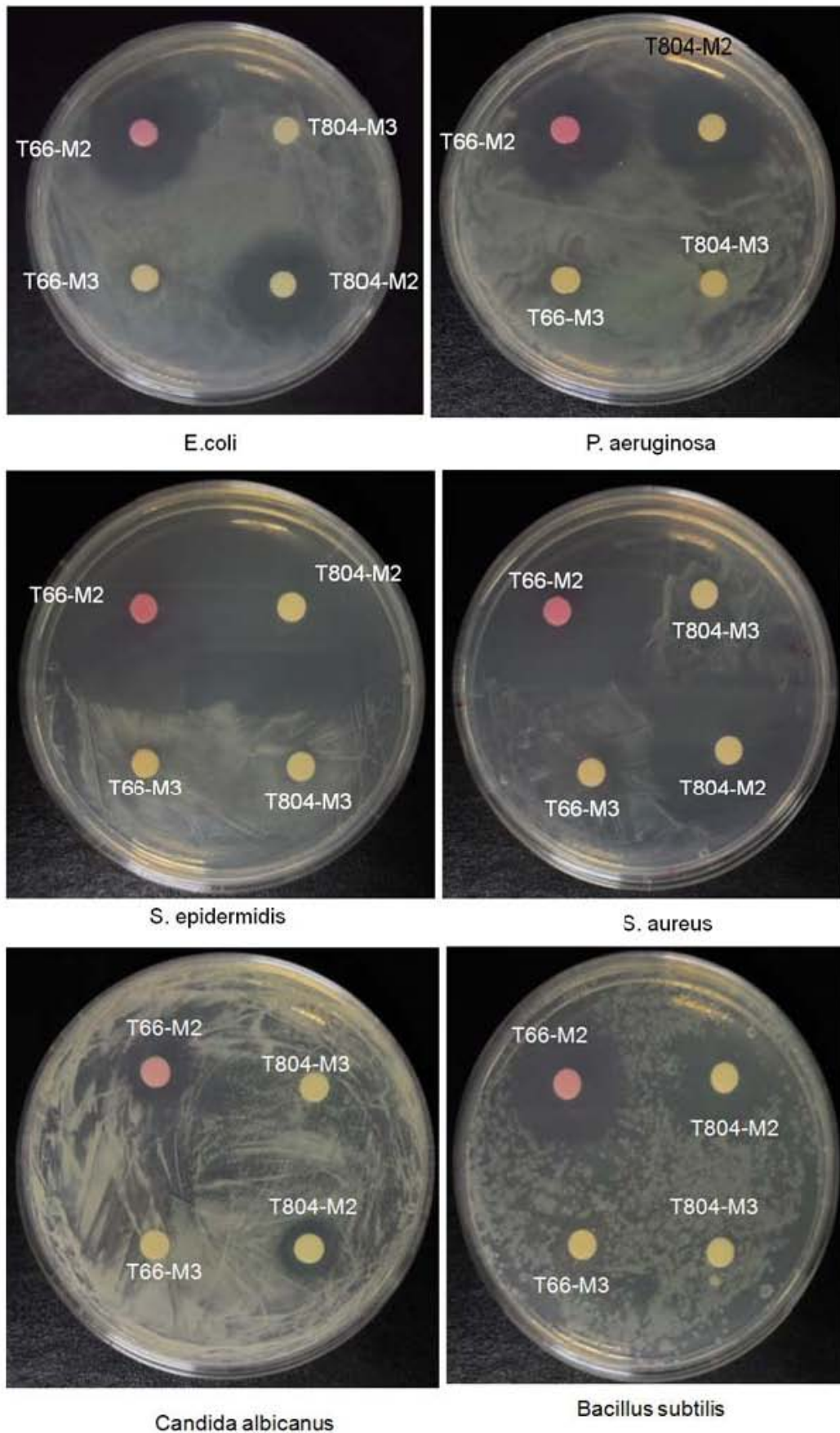
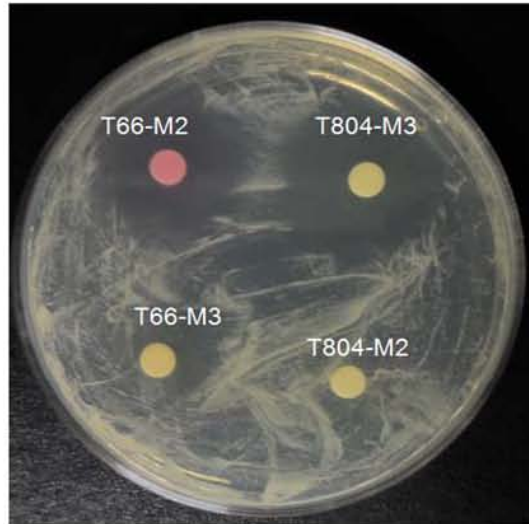


Figure 8-20. Antimicrobial activity of culture extractants from strains T66 and T804 by using the disc assay method



Paenibacillus larvae

Figure 8-20 Continued.

12. 미국부저병균 감염을 위한 포자수집 및 cfu 측정

미국부저병균이 실제로 소비에서 제어 가능한지 조사를 수행하기 위해서는 미국부저병균의 포자를 다량으로 확보하여 감염시킬 수 있는 최소량을 정하는 것이 중요하므로 수집한 포장의 무게 당 몇 마리의 미국부저병균이 생성되는지 조사할 필요가 있다. 내생포장 형성배지에 *P. larvae*를 키운 후 포자가 형성되면 끊어서 말린 후 용기에 보관하였다. 0.1g의 포자를 연속희석법을 통해 희석한 후 각각 희석액에서 0.1mL 씩 아가평판배지에 도말하여 발생하는 콜로니의 숫자를 세어 포자 1g당 cfu 값을 계산하였다(Table 8-19).

계산해본 결과 cfu 값은 1g의 포자 당 약 1.51×10^9 으로 정도로 추정되었다.

Table 8-19. Finding optimal medium for producing antibiotics for Actinobacteria and others

Dilution level	A sample	B sample	C sample	D sample
10^0	too many	too many	too many	too many
10^{-1}	too many	too many	too many	too many
10^{-2}	too many	too many	too many	too many
10^{-3}	1024	2336	1192	1900
10^{-4}	624	476	440	696
10^{-5}	48	138	180	136
10^{-6}	14	54	104	15
10^{-7}	158	17	26	9
10^{-8}	2	16	30	0
10^{-9}	1	5	21	1

13. 백묵병과 석고병 제어를 위한 방선균 분리

꿀벌의 진균성 질병 가운데 가장 피해가 심한 것 중의 하나가 백묵병이고 백묵병을 일으키는 원인균은 *Ascosphaera apis*이다. *A. apis*에 항진균능이 있는 방선균을 조사하기 위해 spot method를 사용하였고 억제환을 지름의 크기를 통해 확보된 방선균의 활성을 서로 비교하였다(Table 8-20 & Fig. 8-22). 석고병도 진균성 꿀벌질병 가운데 역시 많이 알려진 질병으로 원인균인 *Aspergillus flavus*이고 PCR을 통해 *A. flavus*임을 확인하였고(Fig. 8-23), *A. flavus* 대한 항진균능을 조사하여 최고의 고효율균을 조사하였다(Table 8-21 & Fig. 8-24). 한편 두 개의 질병은 양봉업자들도 구별하기 힘든 경우가 많은데 감염된 유충의 모양으로 구별이 가능하다(Fig. 8-21)

Table 8-20. List of actinobacterial soil isolates that showed antifungal activity.

No	Strain	Closest cultivated species/ (Genbank accession no.)	Pairwise Similarity (%)	Inhibition of zone	Size (Diameter: mm)
1	T - 8	<i>Streptomyces ferralitis</i> SFOp68(T)/AY262826	98.94	++	15
2	A - 64	<i>Streptomyces resistomycificus</i> NBRC 12814(T)/ AB184166	99.1	++	11
3	T - 64	<i>Streptomyces sporoverrucosus</i> NBRC 15458(T)/AB184684	99.86	+++	21
4	T - 58	<i>Streptomyces caniferus</i> NBRC 15389(T)/AB184640	99.93	++	14
5	T - 804	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430(T)/ DQ026656	100	+++	21
6	A - 43	<i>Streptomyces anandii</i> NRRL B-3590(T)/ AY999803	99.79	+++	20
7	T - 525	<i>Streptomyces blastmyceticus</i> NRRL B-5480(T)/AY999802	99.18	++	17



Chalkbrood Disease



Stonebrood Disease

Figure 8-21. Distinguishable features between chalkbrood and stonebrood disease



(a) *Streptomyces ferralitis*



(b) *Streptomyces resistomycificus*



(c) *Streptomyces sporoverrucosus* (left) *Streptomyces caniferus* (right)



(d) *Streptomyces racemochromogenes*, *Streptomyces caniferus* (right)



(e) *Streptomyces anandii* (left)

Figure 8-22. Inhibition zone by actinobacterial strains against *Ascosphaera apis*.

Table 8-21. List of actinobacterial soil isolates that showed antibacterial activity.

No	Strain	Closest cultivated species	Pairwise Similarity (%)	Inhibition of zone*	Size (Diameter : mm)
1	A - 64	<i>Streptomyces resistomycificus</i> NBRC 12814(T)/ AB184166	99.1	++	18
2	T - 277	<i>Streptomyces galbus</i> DSM 40089(T)/X79852	99.93	+	9
3	T - 64	<i>Streptomyces sporoverrucosus</i> NBRC 15458(T)/AB184684	99.86	+++	21
4	T - 263	<i>Streptomyces spororaveus</i> LMG 20313(T)/AJ781370	99.86	++	11
5	L - 1	<i>Cupriavidus basilensis</i> CCUG 49340(T)/FN597608	98.25	++	12

* +, ++, and +++ indicate the diameters ≤ 9 , 10 to 19, and ≥ 20 , respectively.

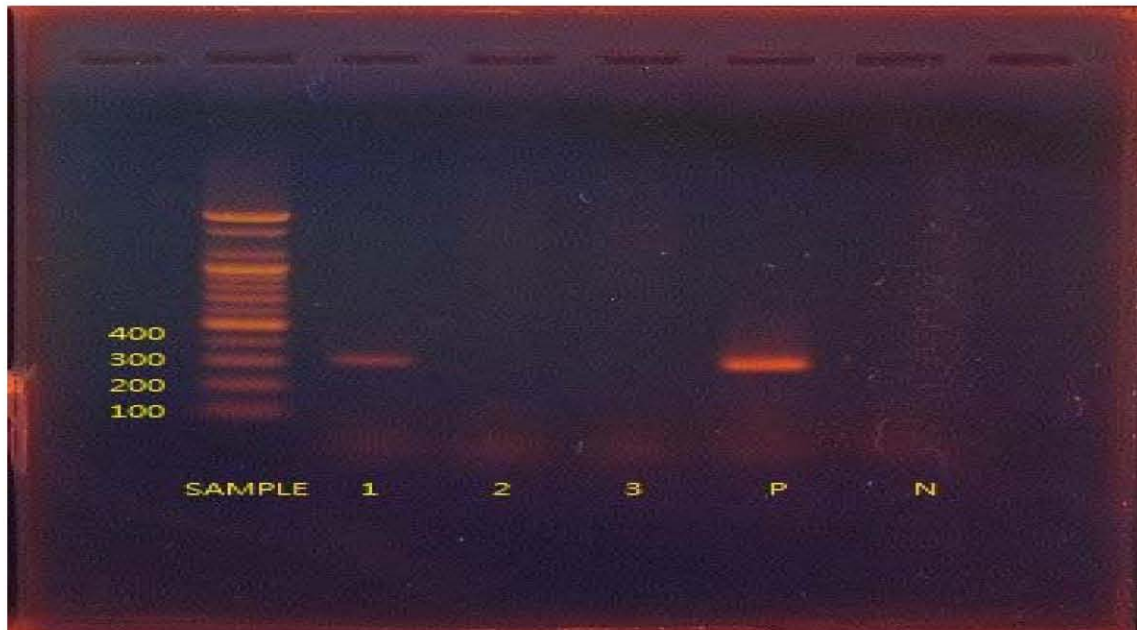


Figure 8-23. PCR test result to identify *A. flavus* on electrophoresis gel



(a) *Streptomyces sporoverrucosus*



(b) *Streptomyces resistomycificus*



(c) *Streptomyces spororaveus*



(d) *Streptomyces galbus*



(e) *Cupriavidus basilensis*

Figure 8-24. Inhibition zone by actinobacterial and other strains against *Aspergillus flavus*.

14. *Streptomyces* sp. T258의 삼등에 추출물을 이용한 물질 분석

Strain T258의 배양액 추출물을 TLC plate를 이용하여 분리한 결과 1개의 spot가 나타났다 (Fig. 8-25). 다른 균주에 비해 적은 수의 spot이었고 TLC plate에 나타난 spot은 여전히 복합물질이기 때문에 다음 단계의 분리과정이 필요하다. 그래서 HPLC를 통해서 5개의 peaks에 해당하는 물질을 fraction을 받아서 조사한 결과 peak 15, 17, 24는 3-5개 정도의 병원성 세균에 효과가 있는 것으로 나타났고 peak 18+19는 7가지 병원성 균에 모두 효과가 있었다(Fig. 8-26 & Table 8-22). 즉 Gram 양성균과 Gram 음성 그리고 yeast와 fungi에도 효과가 있는 것으로 나타나 넓은 범위의 항미생물 스펙트럼을 가지고 있음을 제시하고 있다.

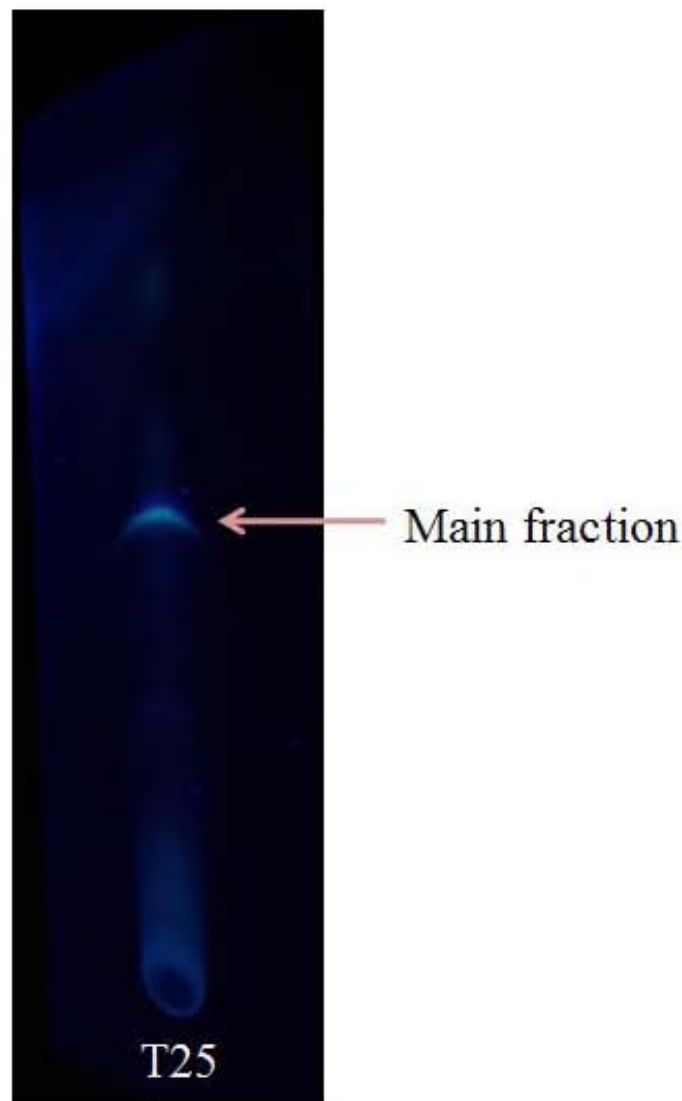


Figure 8-25. TLC plate showing a spot by using the extractant of *Streptomyces* sp. T258

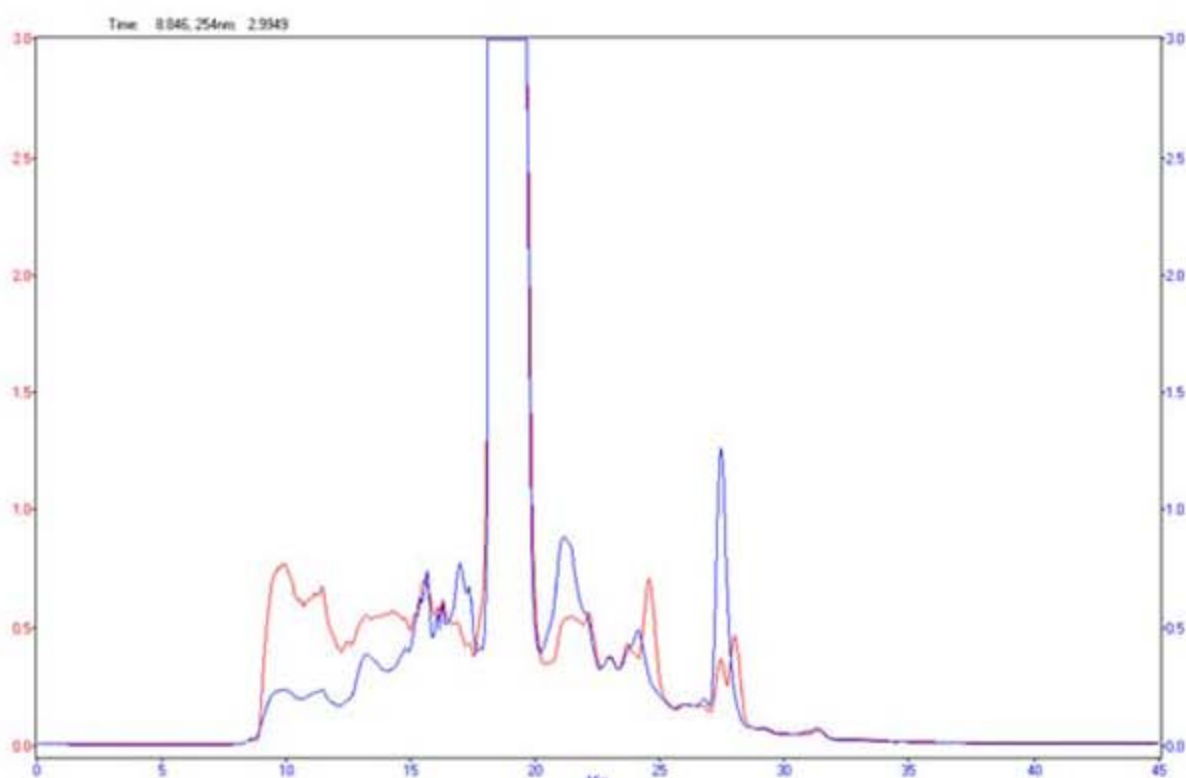


Figure 8-26. HPLC chromatogram by using the extractant of *Streptomyces* sp. T258

Table 8-22. Antimicrobial effect on each pathogens of each fraction obtained from the extractant of *Streptomyces* sp. T258.

Fraction (Peak appearin g time)	<i>Bacillus subtilis</i> KEMB 51201-0 01	<i>Paeniba cillus larvae</i> KACC 14031	<i>Pseudo monas aerugino sa</i> KACC 10185	<i>Staphylo coccus aureus</i> KEMB 4659	<i>Escheric hia coli</i> KEMB 212-234	<i>Candida albicans</i> KACC 30004	<i>Aspergil lus niger</i> KACC 40280
15	+	+	+	-	+	-	-
17	-	+	w	-	w	-	-
18+19	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	-	w	-

Note: +, activity; -, no activity; w, weakly activity

15. *Kitsatospora* sp. T1304의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석

Strain T1304의 배양액 추출물을 TLC plate를 이용하여 분리한 결과 3개의 spot가 나타났다 (Fig. 8-27). 다른 균주에 비해 비교적 적은 수인 3개의 spots를 TLC plate에 나타냈다. 이들 spot은 여전히 복잡물질이기 때문에 다음 단계의 분리과정이 필요하다. 그래서 HPLC를 통해서 10개의 peaks를 얻었고 8개의 fraction을 받아서 조사한 결과 peak 11, 14+15, 18, 17, 19+20, 25는 3-6개 정도의 병원성 세균에 효

과가 있는 것으로 나타났고 peak 12와 13은 7가지 병원성 균에 모두 효과가 있었다(Fig. 8-28 & Table 8-23). 즉 Gram 양성균과 Gram 음성균 그리고 yeast와 fungi에도 효과가 있는 것으로 나타나 넓은 범위의 항미생물 스펙트럼을 가지고 있음을 제시하고 있다. 두 번째 균주인 *Kitazatospora* sp. T1304는 *Streptomyces* sp. T258보다는 두 개의 물질이 넓은 스펙트럼의 항미생물 기능을 가지고 있음을 나타내고 있다.

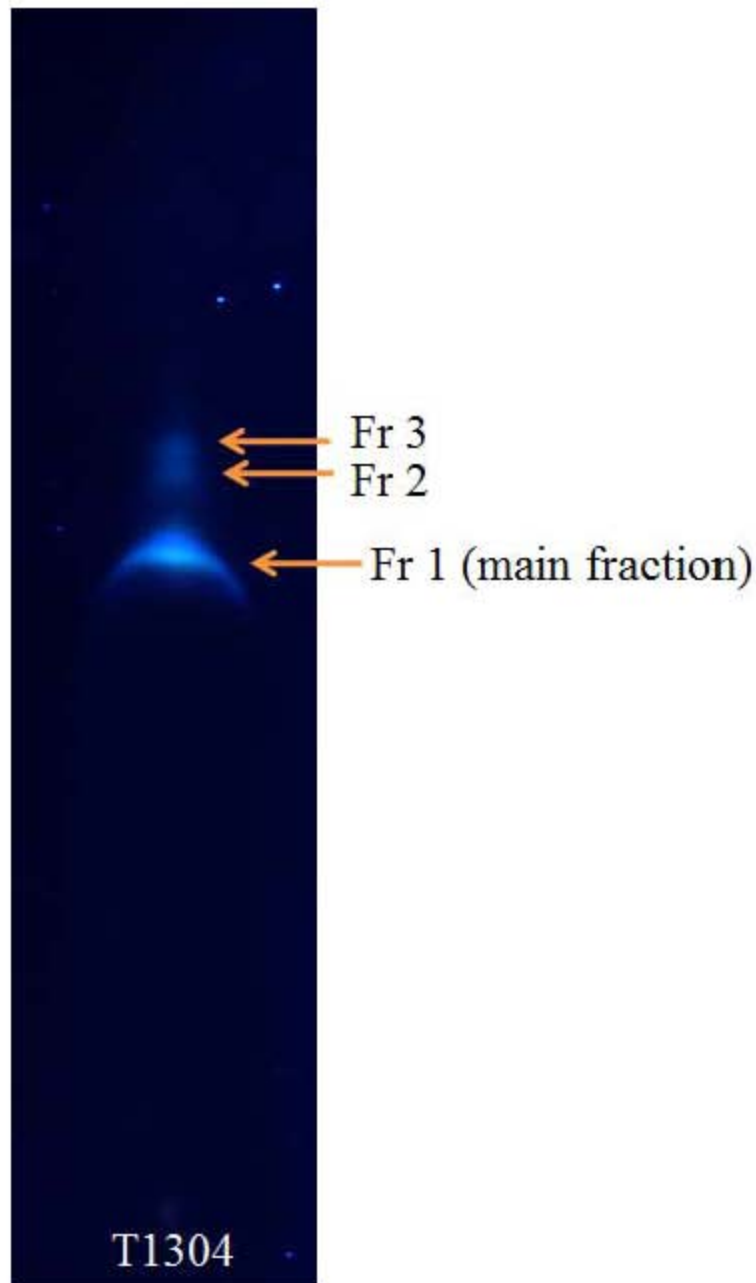


Figure 8-27. TLC plate showing spots by using the extractant of *Kitazatospora* sp. T1304

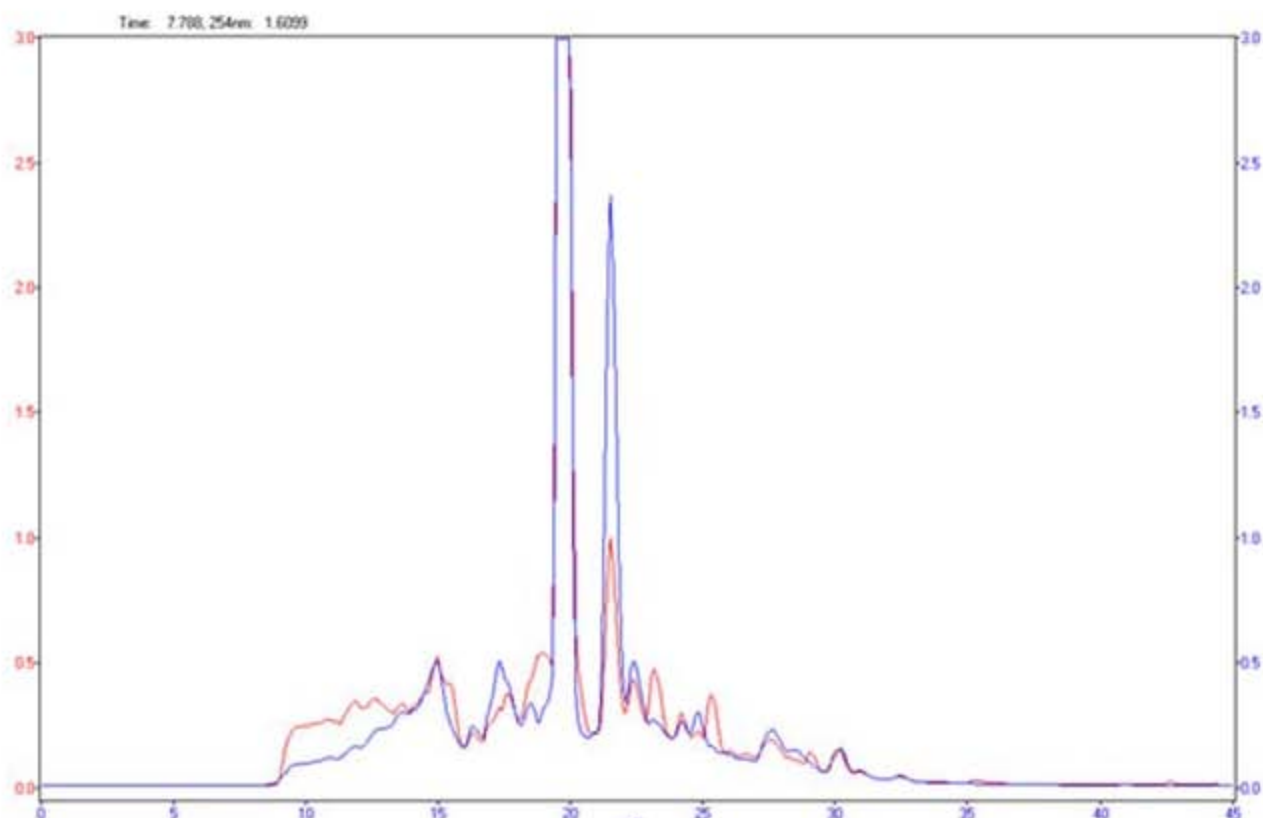


Figure 8-28. HPLC chromatogram by using the extractant of *Kitasatospora* sp. T1304

Table 8-23. Antimicrobial effect on each pathogens of each fraction obtained from the extractant of *Kitasatospora* sp. T1304

Fraction (Peak appearin g time)	<i>Bacillus subtilis</i> KEMB 51201-00 1	<i>Paenibac illus larvae</i> KACC 14031	<i>Pseudo monas aerugino sa</i> KACC 10185	<i>Staphylo coccus aureus</i> KEMB 4659	<i>Escheric hia coli</i> KEMB 212-234	<i>Candida albicans</i> KACC 30004	<i>Aspergil lus niger</i> KACC 40280
11	+	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	w
13	+	+	+	+	+	+	+
14+15	+	+	+	+	+	-	-
18	w	+	-	w	-	-	-
17	+	+	+	+	+	-	-
19+20	+	+	+	+	+	-	-
25	w	+	-	w	-	-	-

Note: +, activity; -, no activity; w, weakly activity

16. *Bacillus* sp. T515의 상동액 추출물을 이용한 물질 분석

Strain T515의 배양액 추출물을 TLC plate를 이용하여 분리한 결과 6개의 spot이 나타났다 (Fig. 8-29). 다른 균주에 비해 비교적 짧은 수의 spots을 TLC plate에 나타냈다. 이들 spot은 여전히 복합물질이기 때문에 다음 단계의 분리과정이 필요하다. 그래서 HPLC를 통해서 12개의 peaks을 얻었고 11개의 fraction을 받아서 조사한 결과 peak 9, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 19+20, 22, 23은 1-6개 정도의 병원성 세균에 효과가 있는 것으로 나타났고 peak 14만 7가지 병원성 균에 모두 효과가 있었다(Fig. 8-30 & Table 8-24). 즉 한 가지 물질만이 Gram 양성균과 Gram 음성 그리고 yeast와 fungi에도 효과가 있는 것으로 나타나 넓은 범위의 항미생물 스펙트럼을 가지고 있음을 제시하고 있다. *Kitasatospora* sp. T1304는 *Streptomyces* sp. T258보다는 더 짧은 항미생물 물질들이 분리가 되었지만 모든 병원성균에 대한 효과가 있는 것은 하나 밖에 없었다.

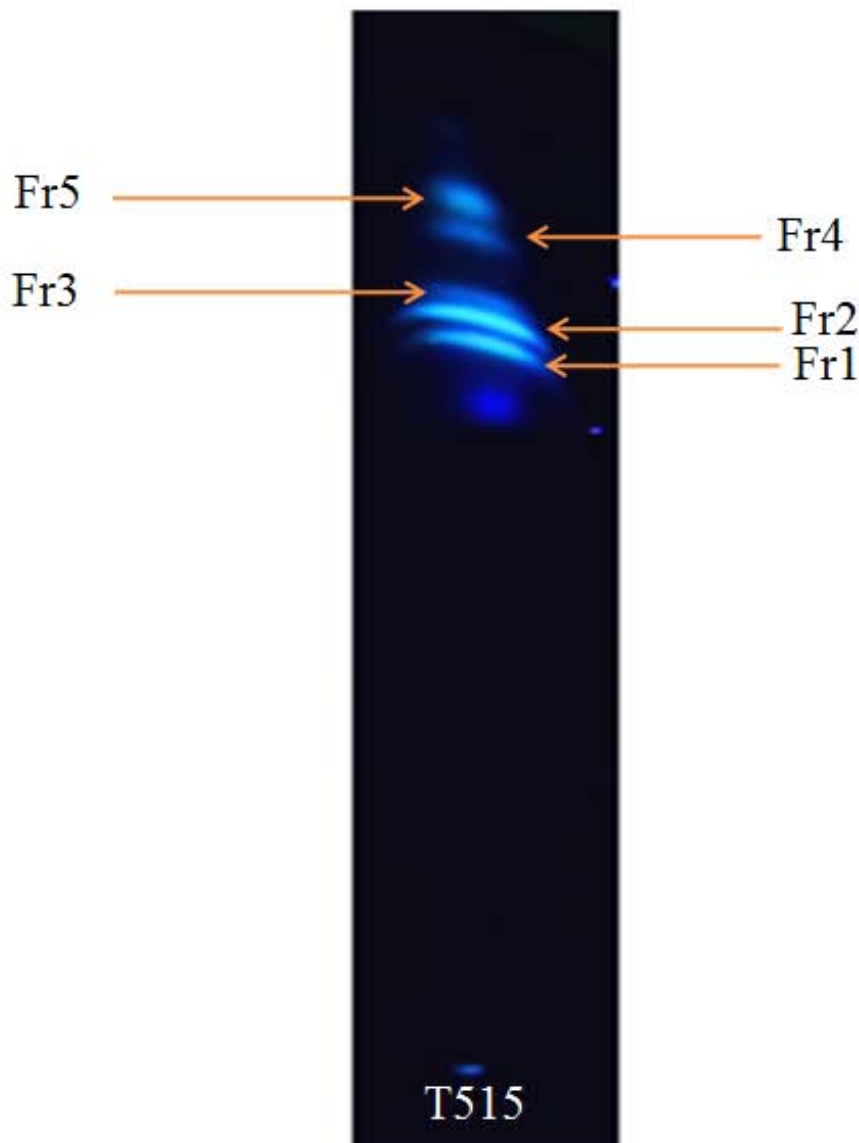


Figure 8-29. TLC plate showing spots by using the extractant of *Bacillus* sp. T515

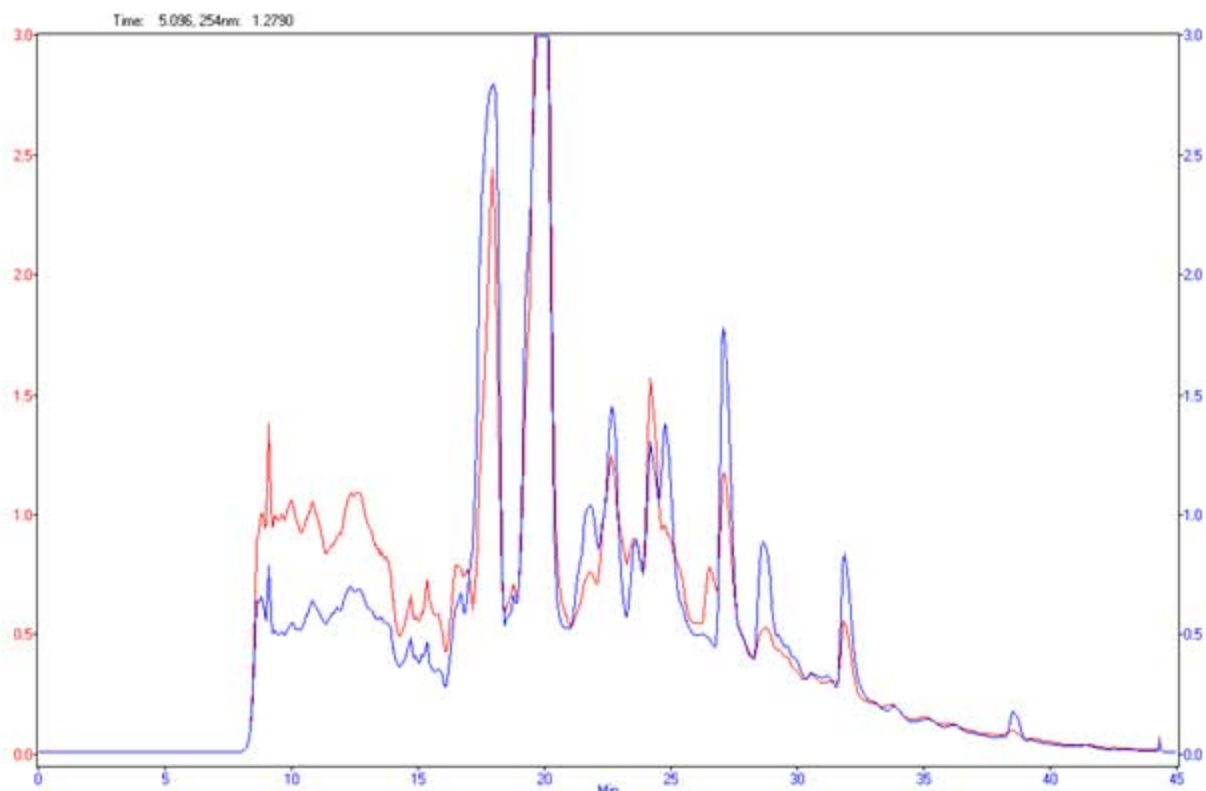


Figure 8-30. HPLC chromatogram by using the extractant of *Bacillus* sp. T515

Table 8-24. Antimicrobial effect on each pathogens of each fraction obtained from the extractant of *Bacillus* sp. T515

Fraction (Peak appearin g time)	<i>Bacillus subtilis</i> KEMB 51201-00 1	<i>Paenibac illus larvae</i> KACC 14031	<i>Pseudo monas aerugino sa</i> KACC 10185	<i>Staphylo coccus aureus</i> KEMB 4659	<i>Escheric hia coli</i> KEMB 212-234	<i>Candida albicans</i> KACC 30004	<i>Aspergil lus niger</i> KACC 40280
9	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	+	-
12	+	+	+	+	w	+	-
14	w	+	+	+	+	+	+
15	w	+	+	-	-	-	-
17	+	+	+	+	+	w	-
18	-	+	+	-	-	-	-
19+20	+	+	-	+	+	w	-
22	-	+	-	+	-	-	-
23	-	-	-	+	-	-	-

Note: +, activity; -, no activity; w, weakly activity

17. Strain UCM-25와 UCM-70의 상등액 추출물을 이용한 물질 분석

Strain UCM-25의 배양액 추출물을 TLC plate를 이용하여 분리한 결과 여러 개의 spot이 나타났으나 1개만 떼고 나머지는 미약한 수준이어서 가장 진한 spot을 기준으로 *Staphylococcus aureus*를 상대로 한 항생테스트를 한 결과 항생능이 존재함을 확인 할 수 있었다(Fig. 8-31). Strain UCM-70도 TLC plate 상에서 여러개의 spot들이 나타났지만 역시 1개의 spot만이 진하였고 *Staphylococcus aureus*에 대한 항생능이 있었다(Fig. 8-32).

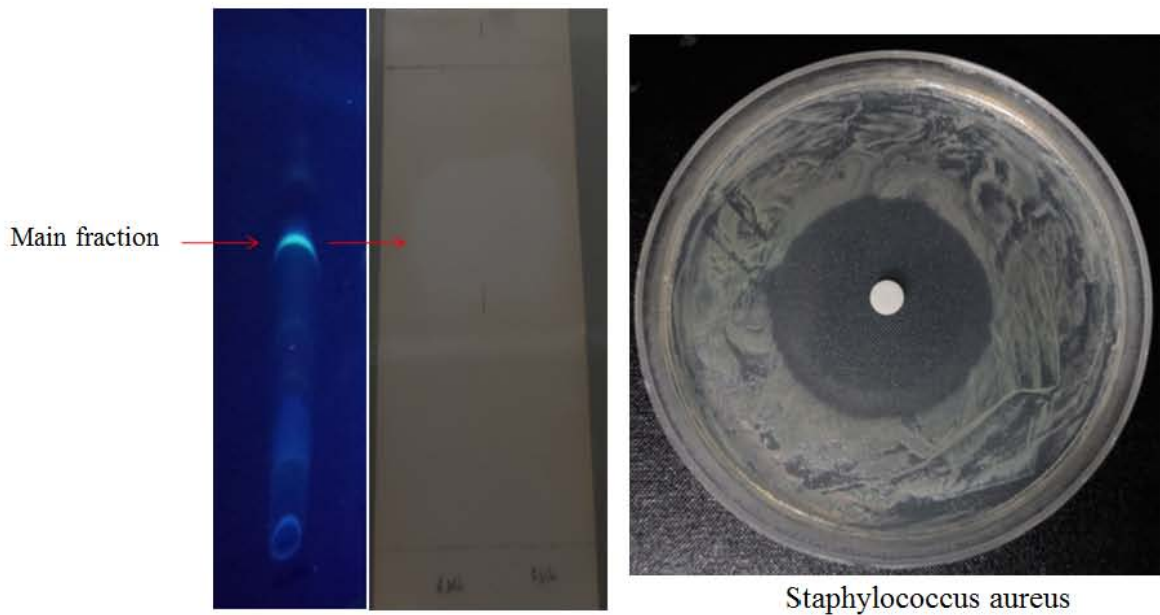


Figure 8-31. TLC plate showing spots and its antimicrobial activity by using the extractant of strain UCM-25

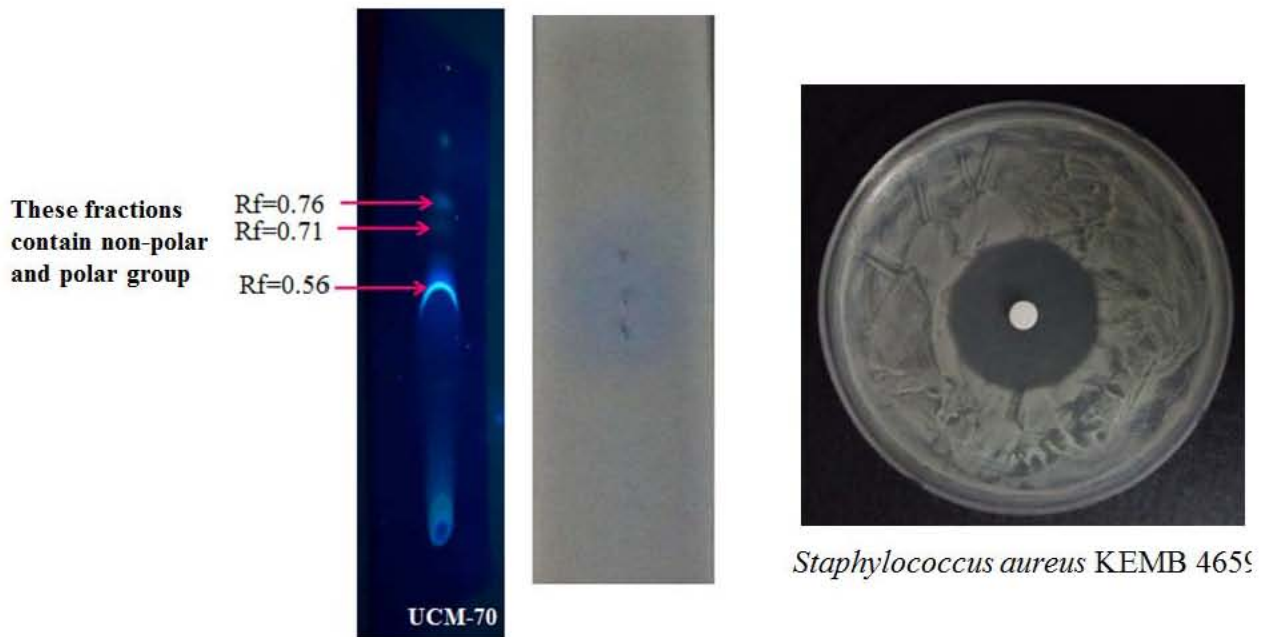


Figure 8-32. TLC plate showing spots and its antimicrobial activity by using the extractant of strain UCM-70

18. 신종 방선균인 *Streptomyces fabae* T66의 분류학적 특징

Strain T66을 한국의 경기도 시흥시 소래지역의 콩과 식물의 근권토아에서 분리하였다. 이 균주는 다양한 병원성균에 대한 항균능력을 가지고 있었다. 16S rRNA 유전자의 유사도를 비교해본 결과 *Streptomyces*속에 속하는 종들과 매우 유사한 것으로 나타났다. 가장 가까운 것부터 나타내면 *Streptomyces arenae* NBRC 13016T 와 98.07%; *Streptomyces. luteogriseus* NBRC 13402T 와 98.05%; *Streptomyces ghanaensis* KCTC 9882T 와 98.03%; *Streptomyces hydrogenans* NBRC 13475T 와 97.86%; *Streptomyces mexicanus* CH-M-1035T 와 97.79% 그리고 *Streptomyces achromogenes* subsp. *rubradiris* NBRC 14000T와 97.73%였다.

계통수를 통한 유연관계 분석은 Fig. 8-33을 통해 나타났다. 이 균주의 세포벽은 chemotype I과 phospholipid type II를 가지고 있고(Fig. 8-36) 메나퀴논(menaquinone) 유형은 MK-9 (H₆), MK-9(H₈), MK-10(H₂)로 나타났고(Fig. 8-34), polar lipid분석은 Fig. 37에 나타내었다. 주요 지방산은 *anteiso*-C_{15:0}, *iso*-C_{16:0}, *iso*-C_{15:0}, *anteiso*-C_{17:0} 이었고(Table 8-27) DNA-DNA hybridization결과는 근연종들과 40% 이하의 유사도를 보여주었다. 포자모양은 spiral chain이었고 rugose spore surface를 가지는 것이 근연종들과 구별되는 점이였다(Fig. 35). 다른 근연종들과 유전학적, 생리학적 표현형의 차이를 통해 신종임을 증명하였다(Table 8-25 & 8-26).

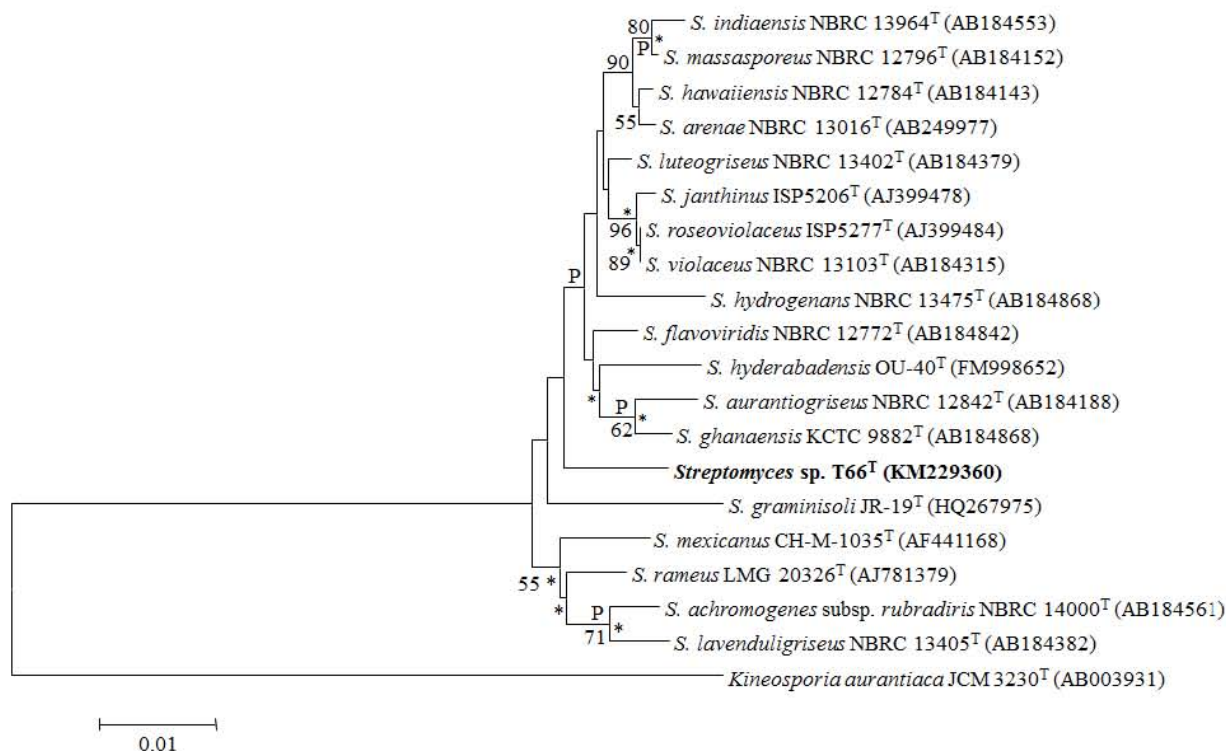


Figure 8–33. Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship of strain T66^T to related taxa. The numbers at the nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on a neighbour-joining analysis of 1000 resampled datasets; only values more than 50% are given. Bar indicates 0.01 substitutions per site. *Kineosporia aurantiaca* JCM 3230^T/AB003931, which has characteristics similar to the genus *Streptomyces*, was used as the outgroup. The asterisks indicate branches of the tree that were also recovered by neighbour-joining and maximum-parsimony, and "P" indicates branches that were also recovered by the maximum-likelihood tree.

Table 8-25. Cultural characteristics of strain T66^T on various media at 28°C for 21 days. The substrate mycelium pigments and diffusible pigments were tested with 0.05N HCl.

Agar medium	Growth	Colour of mycelium		Soluble pigment
		Aerial	Substrate	
Czapek Dox Agar	Poor	Absent	None	None
Potato dextrose agar	Moderat	Absent	Pale yellow	None
Nutrient agar	^e Moderat	Absent	Orange yellow	None
Trypticase soy agar	^e Good	Absent	Yellowish pink	Olive brown
Yeast extract-malt extract agar (ISP2)	Good	Absent	Olive brown	Olive brown
Oatmeal agar (ISP3)	Moderat	White	Dark-blue	Olive
Inorganic salts-starch agar (ISP4)	^e Moderat	White	Pale gray	None
Glycerol-asparagine agar (ISP5)	^e Moderat	Absent	None	None
Tyrosine agar (ISP 7)	^e Moderat	Absent	Dark gray	None
Bennett's modified agar	^e Good	Absent	Light gray	None

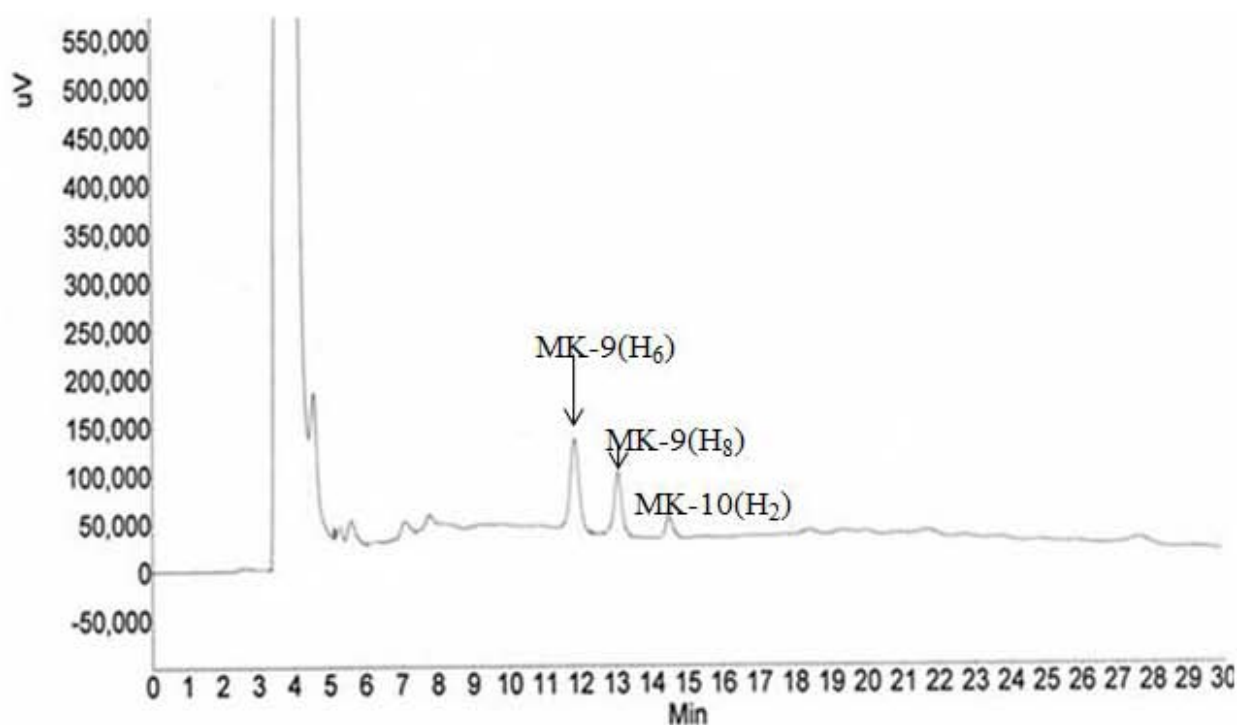


Figure 8-34. HPLC chromatogram of menaquinones in strain T66^T.

Table 8-26. Characteristics that differentiate strain T66^T from closely related members of the genus *Streptomyces*. Strains: 1) T66^T; 2) *S. arenae* NBRC 13016^T; 3) *S. luteogriseus* NBRC 13402^T; 4) *S. ghanaensis* KCTC 9882^T; 5) *S. hydrogenans* NBRC 13475^T; 6) *S. mexicanus* CH-M-1035^T; and 7) *S. achromogenes* subsp. *rubradiris* NBRC 14000^T. All the strains were positive for utilisation of L-tyrose, L-arabinose, D-xylose and D-glucose. Symbols: +, positive; -, negative; w, weakly positive.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Spore surface	Rugose	Spiny ^(a)	Smooth ^(b)	Hairy ^(c)	Smooth ^(b)	Smooth ^(c)	Smooth ^(c)
Spore chain	Spiral	Spiral ^(a)	Spiral ^(b)	Spiral ^(c)	Rectifiable ^(b)	Rectifiable ^(d)	Rectifiable ^(e)
Nitrogen sources (1 %, w/v)							
L-valine	-	+	+	w	-	+	+
L-ornithine	w	+	+	+	+	+	w
L-argine	-	-	-	+	-	-	-
Carbon sources (1%, w/v)							
D-fructose	+	+	+	-	-	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	-	+
Raffinose	-	+	+	-	-	+	-
d- <i>myo</i> -inositol	-	+	+	+	-	+	-
Cellulose	-	+	w	w	-	w	-
D-manitol	+	+	+	+	w	+	+
Growth at:							
10 °C	-	+	+	+	-	-	-
45 °C	-	+	+	+	-	+	-
pH 3	-	+	-	+	-	-	-
pH 10	-	+	-	+	-	-	-
5% NaCl	+	+	-	+	-	+	+
7% NaCl	-	-	-	+	-	-	-
Hydrolysis of (% w/v)							
Milk (1)	+	-	-	-	+	+	w
Xylan (0.4)	+	-	w	w	+	+	-
Nitrate reduction	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S production	+	+	+	-	-	-	+
Melanin production	+	+	+	-	-	-	+
Resistant to antibiotics (µg mL ⁻¹):							
Streptomycin (5)	-	-	+	+	-	-	-
Rifampicin (1)	-	+	+	-	-	-	+
Tetracycline (5)	-	+	-	+	+	+	+
Major cellular fatty acids (at >10%)	<i>an</i> -C _{15:0} , <i>i</i> -C _{16:0} , <i>i</i> -C _{15:0} , <i>an</i> -C _{17:0}	C _{16:0} , <i>i</i> -C _{15:0} , <i>an</i> -C _{15:0} , sum 3	<i>an</i> -C _{15:0} , <i>i</i> -C _{15:0} , C _{16:0}	<i>an</i> -C _{15:0} , C _{16:0} , <i>i</i> -C _{15:0}	<i>an</i> -C _{15:0} , C _{16:0} , <i>an</i> -C _{17:0}	<i>an</i> -C _{15:0} , <i>i</i> -C _{16:0} , <i>an</i> -C _{17:0} , <i>i</i> -C _{15:0}	<i>an</i> -C _{15:0} , <i>i</i> -C _{15:0} , C _{16:0}

i: iso; an: anteiso; sum: summed feature. Data are from this study except (a) from Shirling & Gottlieb (1969), (b) Shirling & Gottlieb (1972); (c), www.dsmz.de/microorganisms; (d), Petrosyan *et al.* (2003); and (e), Labeda *et al.* (2012).

Table 8–27. Profiles and relative content of fatty acids in strain T66^T and the type strains of closely related *Streptomyces* species. Data were determined after growing the bacteria on trypticase soy broth (Oxoid) for 5 days, at 28 °C in this study. –, not detected; not show the value below 0.1%

Strains: 1) T66^T; 2) *S. arenae* NBRC 13016^T; 3) *S. luteogriseus* NBRC 13402^T; 4) *S. ghanaensis* KCTC 9882^T; 5) *S. hydrogenans* NBRC 13475^T; 6) *S. mexicanus* CH–M–1035^T; and 7) *S. achromogenes* subsp. *rubradiris* NBRC 14000^T.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7
Straight-chain saturated							
C _{12:0}	–	0.3	0.2	–	–	–	–
C _{14:0}	0.3	1.7	0.9	2.0	3.6	0.2	0.5
C _{16:0}	8.6	20.7	14.3	18.7	19.8	3.2	10.2
C _{17:0}	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6	0.3	0.4
C _{18:0}	0.2	2.2	0.7	2.3	1.3	–	0.6
Branched saturated							
iso-C _{13:0}	0.3	0.6	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1
anteiso-C _{13:0}	–	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1
iso-C _{14:0}	1.9	0.9	1.7	1.6	2.1	2.5	0.8
iso-C _{15:0}	14.4	19.8	14.7	10.2	8.8	10.2	12.5
anteiso-C _{15:0}	16.0	15.7	25.8	25.9	32.8	28.2	28.9
iso-C _{16:0}	14.5	4.2	8.3	7.3	7.0	19.4	9.4
iso-C _{17:0}	9.1	4.7	4.4	3.8	4.2	4.0	5.1
anteiso-C _{17:0}	12.7	5.4	9.6	9.4	10.0	16.5	18.0
cyclo-C _{17:0}	1.0	0.4	0.4	0.7	1.7	0.2	1.2
iso-C _{18:0}	0.1	–	–	–	0.1	0.2	–
Unsaturated							
C _{15:1} ω6c	–	0.2	0.2	0.2	–	0.1	–
iso-C _{16:1} H	1.6	0.5	1.5	1.0	0.3	3.8	0.9
C _{16:1} ω9c	0.2	–	–	–	–	–	–
anteiso-C _{17:1} ω9c	3.6	2.2	3.4	3.0	0.9	6.0	3.9
C _{17:1} ω8c	1.1	0.6	0.6	0.6	0.3	0.2	0.2
C _{17:0} 10-methyl	0.3	–	–	–	–	0.1	0.1
iso-C _{18:1} H	0.4	–	–	–	–	0.3	–
C _{18:1} ω9c	0.4	0.9	0.5	0.9	1.0	0.2	0.3
Summed feature*							
3	4.9	11.4	6.9	6.8	2.3	0.7	2.5
4	0.4	0.9	0.5	1.1	1.1	–	–
8	0.3	0.4	0.1	0.2	–	0.2	0.2
9	6.6	5.2	3.4	1.9	0.9	2.8	3.6

*Summed features are groups of two fatty acids that cannot be separated by GLC with the MIDI system. Summed features 3, 4, 8 and 9 contained C_{16:1}ω7c/C_{16:1}ω6c; iso-C_{17:1}L/anteisoB; C_{18:1}ω7c/C_{18:1}ω6c and C_{17:1}isoω9c/C_{16:0}10-methyl, respectively.

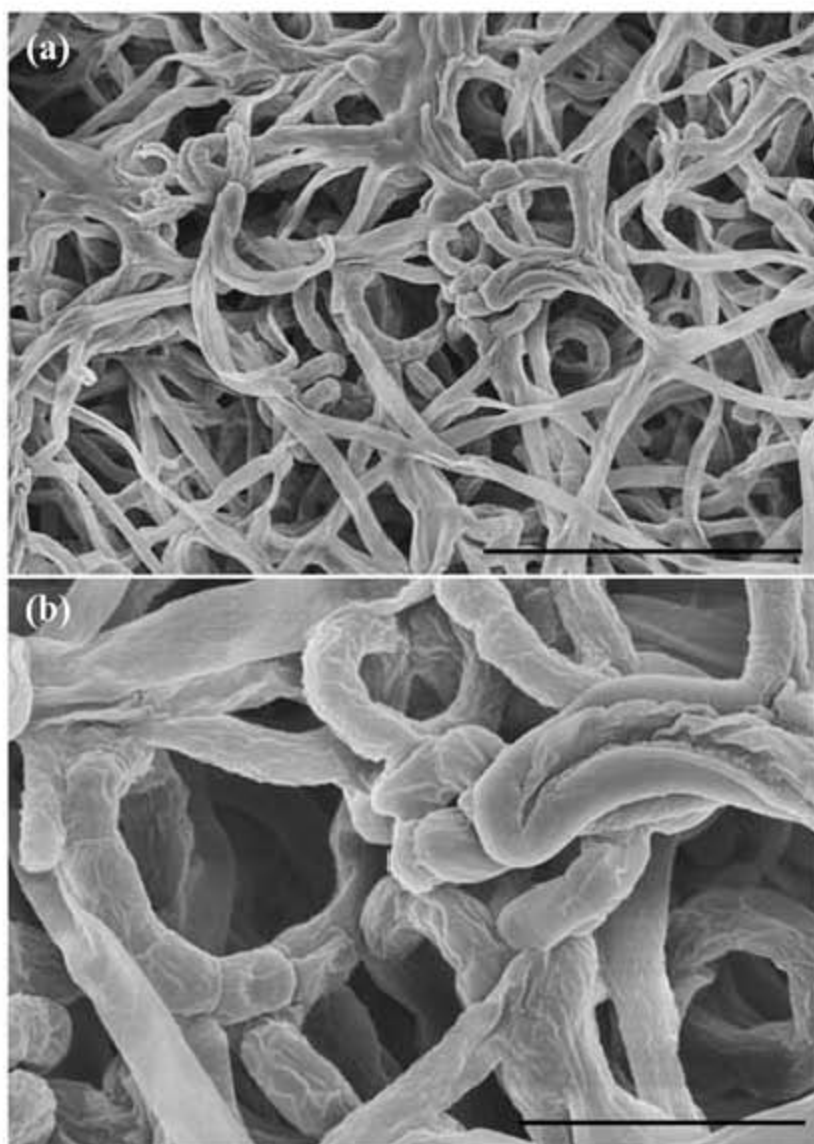


Figure 8-35. Scanning electron micrograph showing the spore chain morphology of strain T66^T grown on inorganic salts - starch agar (ISP 4) for 30 days at 28 °C. Bar represents 10 μm (a), and 3 μm (b).

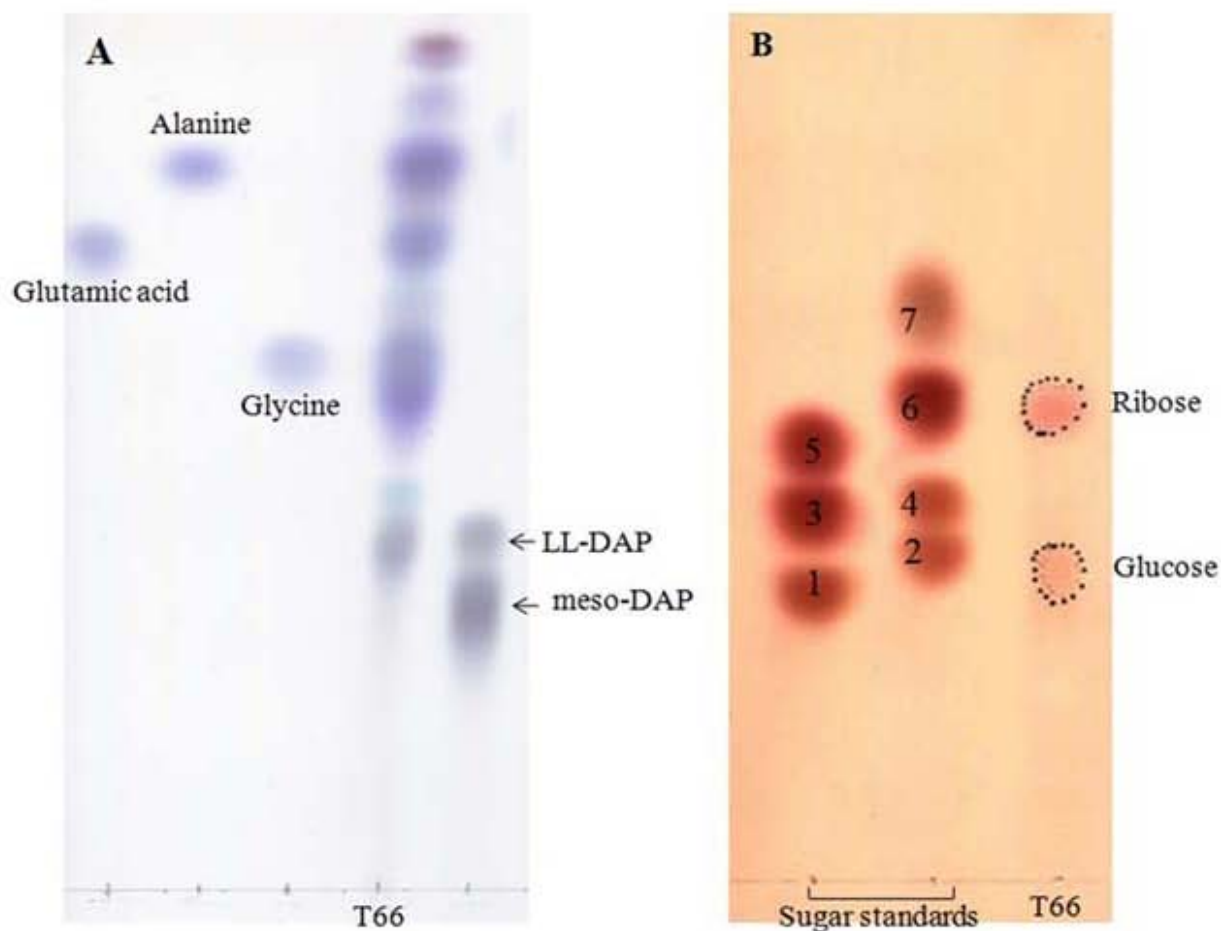


Figure 8-36. Identification of amino acids in cell wall peptidoglycan (A) and sugars in whole cell hydrolysates (B) in strain T66^T by thin-layer chromatography. The cell wall peptidoglycan contains LL-diaminopimelic acid, glutamic acid, alanine and glycine. Whole-cell hydrolysates contain glucose and ribose. Sugar standards: 1- galactose, 2- glucose, 3- arabinose, 4- mannose, 5- xylose, 6- ribose and 7- rhamnose

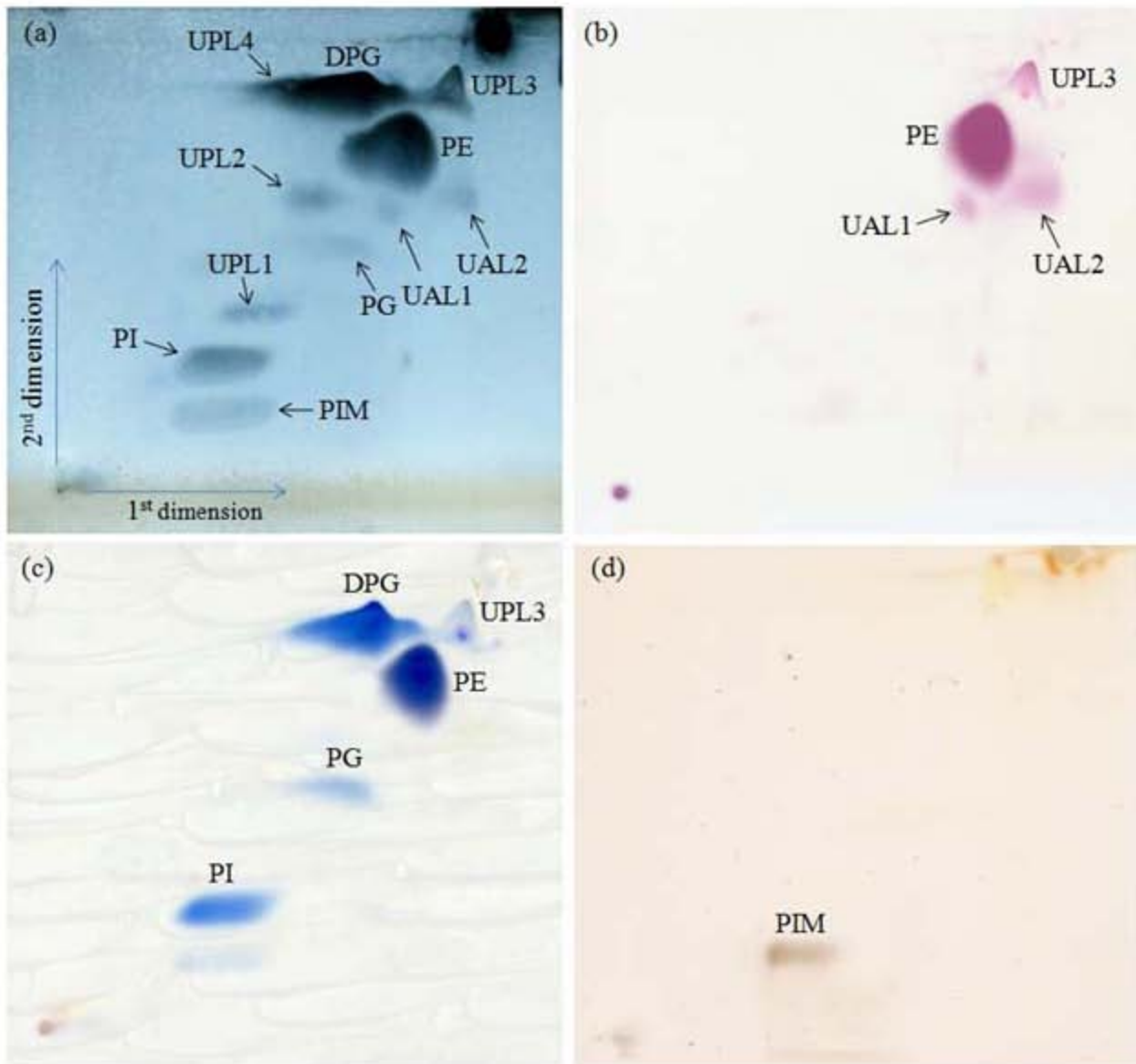


Figure 8-37. Two dimensional thin layer chromatograms of polar lipids of strain T66^T staining with 5 % molybdophosphoric acid (a); ninhydrin reagent (b); molybdenum blue (c); alpha-naphthol reagent at 120 °C for 5 min (d). Diposphatidylglycerol (DPG); phosphatidylethanolamine (PE); phosphatidylglycerol (PG); phosphatidylinositol (PI); phosphatidylinositol mannoside (PIM); four unknown phospholipid (UPL1-4); two unknown aminolipids (UAL1 & 2). Yellow background in the total lipids was removed by 25 % ammonia in room temperature.

제 9 절 화산석(Scoria) 및 분리 방선균의 항균 및 항진균 효능의 발굴

항균, 곰팡이 제거 등의 기능성이 있는 것으로 알려진 (<http://www.jeiuscoria.com/product/03.php?sub=5>) 제주도 화산석이 꿀벌의 세균성 및 진균성 질병제어 효능이 있는지 확인하기 위하여 분말화된 화산석이 함유된 배지에 *Paenibacillus larvae* 및 *Ascosphaera apis*를 도말하여 배양하며 발육 억제 여부를 관찰하여 신허균물질로 발굴하고자 하였다.

1. 스킨리아(송이석)의 항균성 평가



그림 9-1. 스킨리아(송이석)의 외형

스킨리아는 제주 방언으로 송이석이라고 부르는 화산생성물이며, 붉은 빛을 띤 다공질의 천연 세라믹으로서 화산이 폭발할 때 제일 처음으로 분출된 용암이 굳어 생성된다. 수 많은 미세한 구멍을 포함한 다공질 구조로 천연의 흡착력과 살균력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 알카리성의 천연미네랄 성분으로 구성되어 있는 화산석 송이(Scoria)는 마치 황토와 같이 다량의 원적외선을 방출하는 기능성이 있어서, 화장품의 원료로 개발하여 시판하고 있으며, 일부 논문에서 송이를 가축사료에 첨가해 주었을 때 긍정적인 효과를 나타냄이 알려져 있다. 그러나 아직 동물의 질환에 대한 송이의 유용성 평가는 이루어지지 않고 있다.

가. 스킨리아 시료.

Scoria 시료는 350, 450 mesh의 규격 및 흑색의 화산석(X mineral)을 적용하였으며, BHI 배지에 가하고 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다. 화산석의 함량은 표 1.과 같이 조제하여 상온에 굳힌 후, 상단에 *P. larvae*를 하단에 *A. apis*를 도말하여 72시간 관찰하며 AFB 및 백목병 원인체의 성장저해정도를 조사하였다.

나. 송이석 함유 배지에서 미국부저병균 *Paenibacillus larvae*의 배양

*P. larvae*의 경우는 대조군에 비하여 350mesh scoria의 plate에서 발육억제의 경향을 보였으며, 5% 용량에서 뚜렷하여 추가적인 적용의 가능성을 보였다.

표 9-1. Scoria 시료의 적용 후 *P. larvae* 발육

Scoria	농도(% w/v)	20h	48h	72h
Medium	BHI	++	+++	+++
	PDA	+	++	++
X mineral	5	+	++	++
	0.5	+	++	++
450 mesh	5	++	++	++
	2.5	++	++	++
	0.5	+++	+++	+++
350 mesh	5	+	+	+
	2.5	++	++	+++
	0.5	++	++	+++

다. 송이석 함유 배지에서 백목명균 *Ascosphaera apis*의 배양

*A. apis*의 경우는 X mineral 첨가배지에서는 오히려 성장속도의 증가를 보였다. 350 mesh scoria 배지에서는 5%에서 발육속도 지체를 보였으나, 의미있는 차이로 보기에 어려웠다.

이상의 결과들은 세균 및 곰팡이의 발육을 위한 배지가 존재함에 따라 실제 사육상의 조건과 차이가 있을 것으로 판단되며, 사육상 내부에 도포 후, 분리배양을 시도하여 보다 현실적인 결과를 확인해야 할 것으로 사료되었다.

표 9-2. Scoria 시료의 적용 후 *A. apis* 발육

Scoria	농도(% w/v)	20h	48h	72h
Medium	BHI	干	++	+++
	PDA	-	+	+++
X mineral	5	+	++	++
	0.5	+	++	++
450 mesh	5	干	+	++
	2.5	干	++	++
	0.5	+	++	+++
350 mesh	5	干	+	++
	2.5	干	++	+++
	0.5	干	++	++

한편, scoria를 병원체 증식억제의 용도로 직접적인 적용은 기술적인 어려움이 있을 것이나, 이를 이용한 도료로 개발할 경우 사육상의 외부도포용으로 효용성이 매우 높을 것으로 사료되었다.

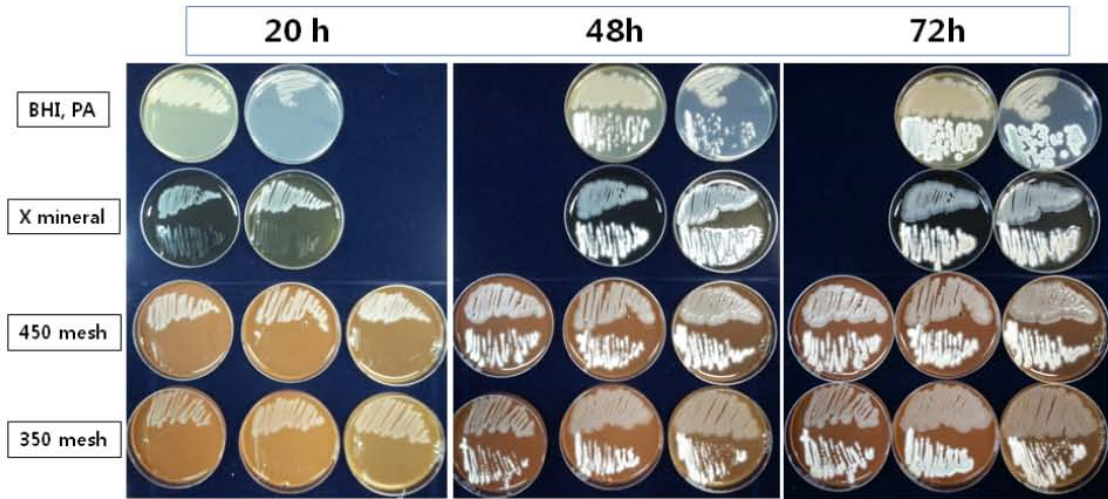


Fig BHI agar plate (상단 우측만 PDA배지). Dish 상단부는 P. larvae, 하단부는 A. apis 도말.

그림 9-2. 스크리아(송이식)을 함유한 각 배지에서 미국부저병균과 백묵병균의 도말

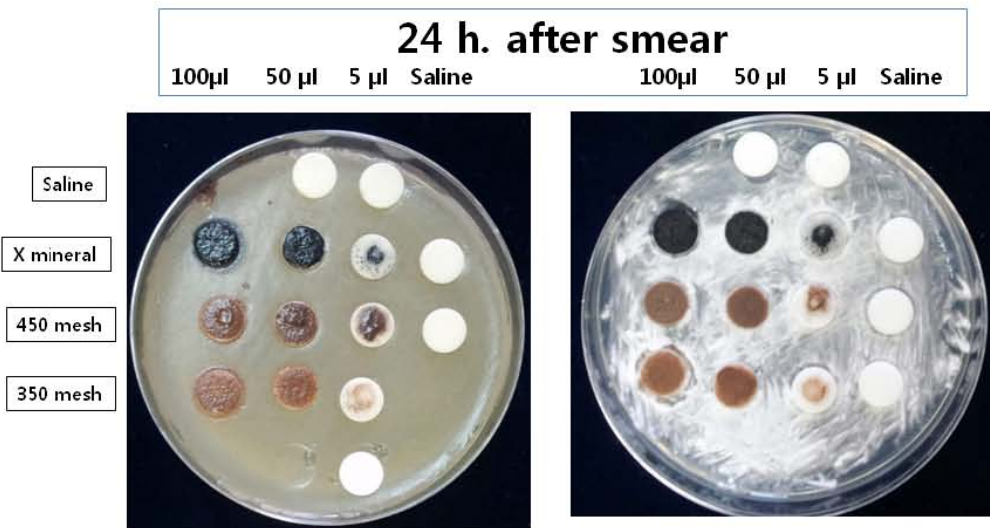


Fig. P. larvae 도말 BHI agar plate (좌측) & A. apis 도말 PDA (우측)

그림 9-3. 스크리아(송이식)을 함유한 각 배지에서 미국부저병균과 백묵병균의 배양

2. 환경분리 Streptomyces X의 석고병 억제 효능

꿀벌의 백묵병(chalkbrood disease)은 *Ascospaera apis*의 균사가 자라면서 유충의 체액이 말라 백묵과 같이 굳어지는 질병으로 늦은 봄이나 초여름 사이에 벌통의 출입구나 벌통 내의 바닥, 소방 그리고 벌통 주변에서 감염된 것들을 흔히 볼 수 있는 질병이다. 유충이 이 병에 걸리면 봉개 후 죽게된다. 백묵병은 동종이주형으로 (Olive & Spiltoir) 단일균주에 감염되면 유충은 백색의 형태로 변하며 폐사하고, 두 균주가 동시에 감염되면 갈색 내지 흑색으로 굳어 폐사하게 된다. 병원균은 유충벌의 먹이와 함께 장내에 들어가 발아하여 균사가 자라면서 포자를 형성한다. 감염 적온은 약 30℃ 전후이지만 서늘하고 다습한 조건에서 발생하기 쉬우며 강균에

비하여 약균에서 발생하기 쉽다.

감염경로는 유충에게 먹이를 주는 과정에서 오염된 화분의 섭취 또는 1차 감염된 유충의 사체에서 나온 포자에 의해 봉균 전체에 전염되며, 봉균간 감염은 일벌간의 직, 간접적인 접촉이나 오염된 소비, 양봉기구의 사용에 의하여 이루어진다.

이 질병에 대한 전문 치료약은 현재까지 없으며 철저한 사양관리를 통한 예방만이 최선이라 할 수 있다. 양봉인들의 경험에 의하여 하이진, 프로피온산나트륨, 옥살산, 옥시마시신, 티몰, 시더오일, 에센셜오일 등 다양한 적용을 소개하고 있으나 효과가 일시적이며 생산물의 오염의 우려가 있다.

오염된 양봉기구를 통하여 전파된다는 점, 아직까지 우수한 효능을 보이는 예방 및 치료약제가 없다는 점에서 원인진균에 대한 길항을 보이는 미생물을 응용한 방제 방법의 검토가 필요할 것으로 판단되어, 제주대학교 수의과대학에서 보유하고 있는 다양한 균주 라이브러리 중에서 곰팡이의 발육을 억제할 수 있는 미생물을 screening 하여 이중, 대기환경 중에서 분리된 곰팡이 억제균을 적용시켜보았다. 분리균은 그람양성 간균으로서 형태적으로 *Streptomyces*에 가까우며 이 균이 꿀벌의 백목병의 치료 및 예방에 효과가 있는지를 조사하기 위하여 *in vitro*에서 곰팡이 억제효과를 평가하였다..



그림 9-4 분리주의 *in vitro*에서 *Ascospaera apis* 성장억제효과.

사진 좌: *Streptomyces* X (좌), 포도상구균 (상), 대장균 (우), 대조면 (하). 사진 우: 좌측의 *Streptomyces* X는 우측의 *Ascospaera apis*의 발육을 억제하고 있다.

가. 곰팡이 발육억제 효과

곰팡이 억제효과를 평가하기 위하여 사용한 배지는 potato dextrose agar(PDA)였으며, PDA배지위에 5일간 배양된 백목병의 원인체인 *Ascosphaera apis* (국내분리주, 경기대학교)를 열십자로 희석배양하고 각각의 끝에 곰팡이 억제세균, 포도상구균, 및 대장균을 점적하였다. 이 배지를 30C에서 5일간 배양한 결과 곰팡이 억제세균 쪽으로는 *Ascosphaera*가 증식하지 않음을 확인하였다.

나. 세포독성

SP/2 line cell, Vero cell line 에 배양 상층액을 가하여 세포성장 억제를 비롯한 세포독성을 조사한 결과 무처치 대조 세포군과 비교하여 성장 억제 등의 독성이 발현되지 않았다.

보다 정확하게 억제여부를 평가하기 위하여 곰팡이억제균과 백목병 원인체를 PDA에 희석배양하여 동일한 방법으로 배양한 결과 억제균 쪽으로 곰팡이의 균사가 침범하지 못하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는, 제 3세부과제의 결과와 연계하여 최종적인 유효물질의 개발에 투입할 것으로 결정하였다.

다. 잠정적 결론

*Streptomyces X*는 *Ascosphaera apis* 의 억제능이 있으며 현저한 독성을 보이지 않는 점에서 백목병 예방제로서의 응용 가능성이 있는 것으로 판단된다. 이를 위하여 균주의 동정을 시행하고, 추가적인 적용시험과 안전성 시험연구는 제 3세부과제와 연계하여 지속적으로, 추가적으로 수행하고자 한다.

제 10 절 낭충봉아부패병의 예방 및 치료를 위한 유전자 치료방법 개발

1. 연구과제의 개요 및 목표

국내 토종벌에 발생하는 한국형 낭충봉아부패병의 예방 및 치료를 위하여 KSBV siRNA를 제작하여 그 효능을 확인하고, 현장에 적용시키는 것을 목적으로 하였다.

구체적 목표들은 아래와 같았다.

- 유전자 치료제 후보 선발
- 유전자 치료제 2종의 후보 siRNA 선발 - 후보 siRNA 선발을 위한 스크리닝 시스템 확립 및 인공감염을 위한 낭충봉아부패병 바이러스의 분리
- 각 후보 siRNA 평가
- 후보물질 효과 검증을 위한 평가 시스템 개발
- siRNA의 실험실적 효과 확인
- 후보 siRNA의 SBV 발현 억제 능력 확인 및 최적 siRNA 선발

2. 연구의 결과

낭충봉아부패병의 유전자 치료를 위하여 Chinese sacbrood virus (CSBV) (GeneBank: AF251124; 1547-2142nt)의 structural protein VP1 gene을 이용한 dsVP1 (596bp) 부분과 Structural polyprotein open reading frame (GeneBank: AF469603; 5604-6314nt)을 이용한 dsSBV1 (711bp)를 일차 유전자 후보로 선발하여 siRNA 합성을 합성하여 사용하였다.

Sacbrood virus를 feeding 범으로 인공감염 시킨 후, 두 후보 종의 siRNA 처리한 후, 각 실험군의 생존률 및 보유 유전자를 정량분석한 결과 structural protein VP1 gene을 이용한 dsVP1 siRNA를 처리한 실험군에서 높은 치료 효과를 확인하였다.

가. 에벌레 인공 감염을 위한 낭충봉아부패병 바이러스의 분리

Conventional PCR을 통해 낭충봉아부패병에 감염이 확인된 에벌레 시료를 PBS에 분쇄하여, 0.45um 및 0.20um syringe filter를 사용해서 filtering 시켜 시료를 준비한다. 2s, 3s ON/OFF, 총 30s 동안 sonication 시킨 후, 10%~50% 범위에서 sw41ti rotor, 32500rpm, 4hr 조건으로 sucrose

gradient를 수행하였다 (Beakman). 40% 층에 존재하는 바이러스 밴드를 수거하여, 25000rpm, 12 시간 ultracentrifuge 하여 D.W.를 사용하여 elution 하여 transmission electron microscopy 촬영을 수행하였다. TEM 측정 결과 27.8 ± 0.4 nm 크기의 바이러스 입자들을 확인 할 수 있었으며, 이는 다른 picornavirus와 형태적 유사성을 가지고 있었다.

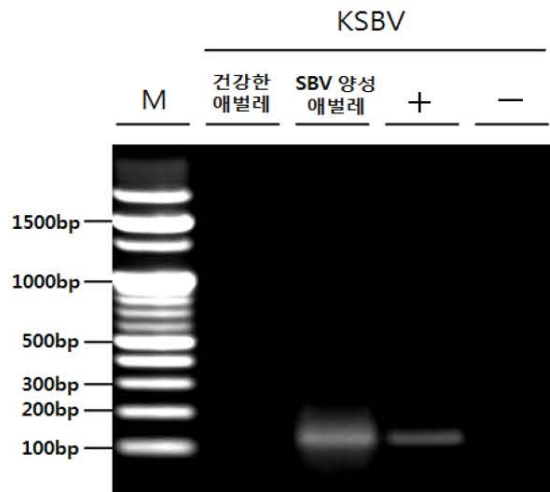


그림 10-1. 병성감정 시료 중 PCR을 이용해 SBV 양성으로 판명된 꿀벌 유충 시료 선정

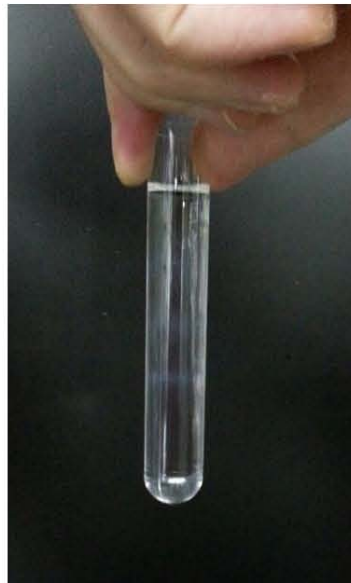


그림 10-2. 낭충봉아부패병에 감염된 애벌레 시료로부터 낭충봉아부패병 바이러스의 분리

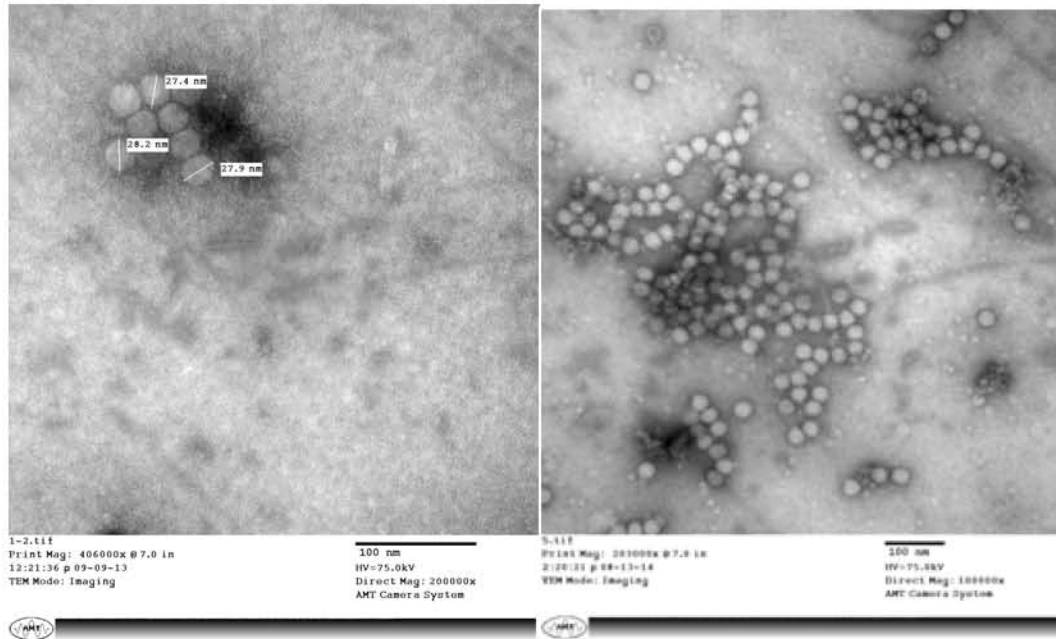


그림 10-3. 인공감염 꿀벌 유충 내 Korean Sacbrood virus (KSBV)의 Transmission electron microscopy 촬영사진

나. 유전자 치료를 위한 후보 유전자 선발

Chinese sacbrood virus (CSBV) (GenBank: AF251124; 1547-2142nt)의 structural protein VP1 gene을 이용한 dsVP1 (596bp) 부분과 Structural polyprotein open reading frame (GenBank: AF469603; 5604-6314nt)을 이용한 dsSBV1 (711bp)를 일차 유전자 후보로 선발하여 siRNA를 합성하여 사용하였다.

Primers	Sequence (5'→3')	Length
CSBV:dsVP1 synthesis		
T7VP1F	taatacgaactcactatagggcgaAGATGTGAACGCTTACCCTG AT	596 bp
T7VP1R	taatacgaactcactatagggcgaCTCCTCGCATATACACCAAA ACTT	
CSBV:dsSBV1 synthesis		
T7SBVF	taatacgaactcactatagggcgaCCTTCGATGAGTGAGAGAAC	711 bp
T7SBVR	taatacgaactcactatagggcgaCTCAACACGCGCTGGATTC	

표 10-1. List of primer for PCR

(1) dsRNA gene 확보를 위한 클로닝

(가) cDNA 합성

invitrogen SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit (Cat.No.18080-051)를 사용하여 수행하였다. 먼저 dsRNA를 D.W.를 이용하여 1000배 희석시킨 후 SBV1 long dsRNA와 VP1 long dsRNA를 희석시켰다. 그리고 1000배 희석된 dsRNA 4 μ l에 5 μ l의 Reverse Primer (10pmol/ μ l), 10mM dNTP mix 1 μ l를 넣고 총 10 μ l가 되도록 하였다.

Incubation 온도를 2가지 조건(65 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C)으로 나눈 후 앞의 혼합액을 5분 간 반응시키고 1분 간 ice 상에 둔 후에 10X RT buffer 2 μ l, 25mM MgCl₂ 4 μ l, RNase OUT 1 μ l, SuperScript III RT 1 μ l를 추가하여 총 양이 20 μ l 되도록하였다. 앞에 조성한 반응액을 50 $^{\circ}$ C에서 50분, 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후에 RNase H 1 μ l를 추가한 후에 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응 시킨 후 다음 실험의 사용을 위해 -20 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

(나) PCR 수행

앞서 수행한 cDNA 합성과정 중 4가지로 조건을 달리한 샘플(①65 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응시킨 SBV1 long dsRNA, ②90 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응시킨 SBV1 long dsRNA, ③65 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응시킨 VP1 long dsRNA, ④90 $^{\circ}$ C에 5분 동안 반응시킨 VP1 long dsRNA)과 두 개의 프라이머 세트(T7SBVF, T7SBVR 와 T7VP1F, T7VP1R)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

PCR 수행을 위하여 TOPsimple™ DryMIX-HOT (Enzynomics, Cat.# P581H)를 사용하였으며 cDNA 1 μ l, Priemr F(10pmol) 1 μ l, Priemr R(10pmol) 1 μ l, D.W. 17 μ l을 조성하여 PCR을 진행하였다. PCR 최적조건을 찾기 위하여 annealing 온도를 50~65 $^{\circ}$ C 사이(50 $^{\circ}$ C, 53 $^{\circ}$ C, 55.9 $^{\circ}$ C, 62.5 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C)에서 변화를 주었다. 또한 Ex Taq™ kit(TaKaRa, RR001A)를 이용하여 4가지 샘플을 PCR을 수행하였으며 TaKaRa Ex Taq™ 0.25 μ l, 10X Ex Taq Buffer 5 μ l, dNTP Mixture (2.5mM each) 4 μ l, Primer F 1 μ l(10pmol/ μ l), Primer R 1 μ l(10pmol/ μ l), D.W. 37.75 μ l를 넣고 총 양이 50 μ l 되도록 하였다.

PCR 조건은 전변성(Pre-denaturation) 과정이 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 1cycle, DNA 증폭과정 중에는 변성(Denaturation) 과정이 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 어닐링(Annealing) 과정이 50~65 $^{\circ}$ C에서 15초, 합

성(Extension)과정이 72℃에서 15초로 40 cycle로 수행하였으며 최종 합성(Final extension)과정을 72℃에서 10분 동안 진행하였다.

cDNA합성 조건	65℃	90℃	65℃	90℃	
Annealing Temp.	Sample NO.1	Sample NO.2	Sample NO.3	Sample NO.4	사용 kit
	SBV1 long dsRNA	VP1 long dsRNA	VP1 long dsRNA	VP1 long dsRNA	
65℃	1	2	3	4	TOPsimple™ DryMIX-HOT
62.5℃	5	6	7	8	TOPsimple™ DryMIX-HOT
55.9℃	9	10	11	12	TOPsimple™ DryMIX-HOT
53℃	13	14	15	16	TOPsimple™ DryMIX-HOT
50℃	17	18	19	20	TOPsimple™ DryMIX-HOT
55.9℃	21	22	23	24	TaKaRa Ex Taq

표 10-2. cDNA합성조건과 어닐링 온도와 PCR 시료 조건을 달리한 후 PCR을 수행한 DNA 증폭산물정보

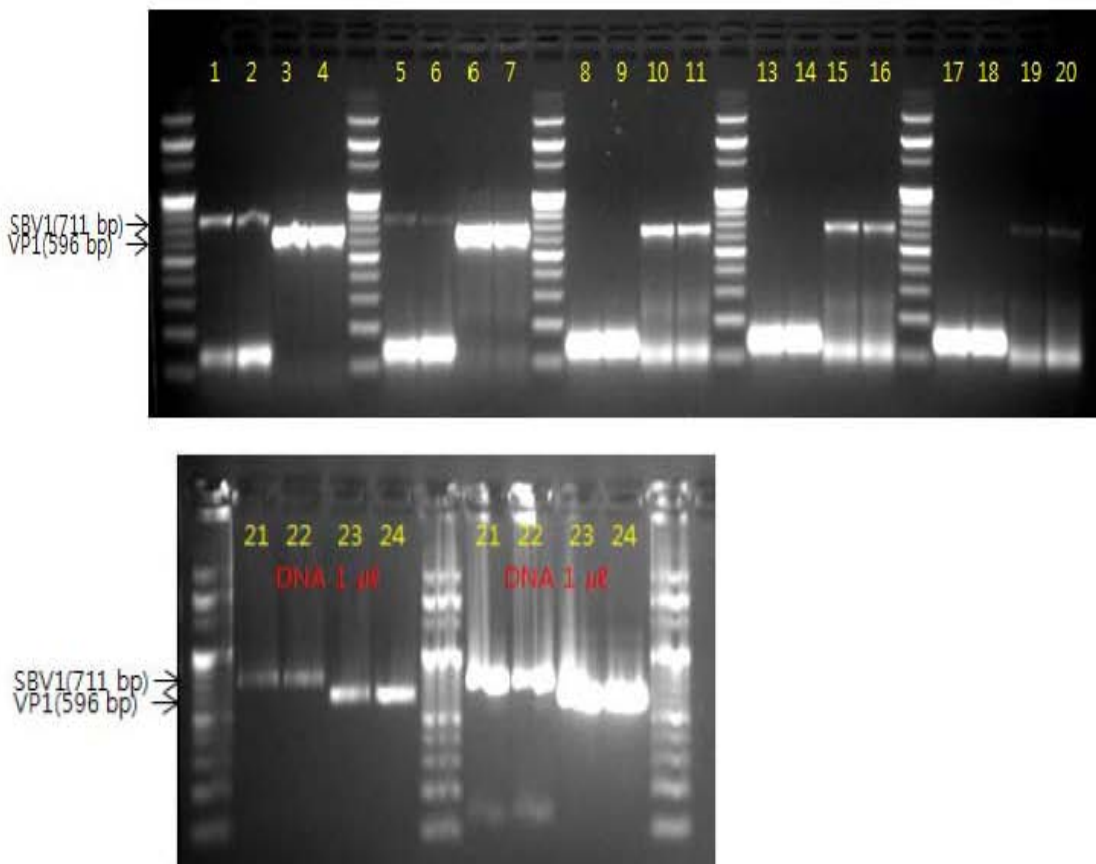


그림 10-4. cDNA합성조건과 어닐링 온도와 PCR 시료 조건을 달리한 후 PCR을 수행한 DNA 증폭산물 전기영동 사진

Lane; dsSBV1 711bp, dsVP1 596bp

cDNA합성 조건	65℃		90℃		65℃		90℃		
Annealing Temp.	Sample NO.1		Sample NO.2		Sample NO.3		Sample NO.4		
	SBV1 long dsRNA				VP1 long dsRNA				사용 kit
65℃	1	++	2	++	3	+++	4	+++	TOPsimple™ DryMIX-HOT
62.5℃	5	+	6	+	7	+++	8	+++	TOPsimple™ DryMIX-HOT
55.9℃	9	-	10	-	11	++	12	++	TOPsimple™ DryMIX-HOT
53℃	13	-	14	-	15	+	16	+	TOPsimple™ DryMIX-HOT
50℃	17	-	18	-	19	+	20	+	TOPsimple™ DryMIX-HOT
55.9℃	21	+++	22	+++	23	+++	24	+++	TaKaRa Ex Taq

표 10-3. cDNA합성조건과 어닐링 온도와 PCR 시료 조건을 달리한 후 PCR 결과 분석표

다. PCR 증폭산물을 전기영동한 gel 내 DNA 추출

QIAquick® gel extraction kit(QIAGEN, Cat. 28704)를 이용하여 앞서 수행한 PCR 증폭 산물 중 4개를 전기영동한 후 gel 내 DNA를 추출하였다. 먼저 증폭이 확인된 PCR 다량의 증폭산물을 전기영동하여 DNA 밴드를 잘라낸 후 잘라낸 gel의 3배 양(gel 100mg당 300µl)의 QG buffer를 추가하고 50℃에 10분 반응시켰다. 그리고 2-propanol을 잘라낸 gel의 양만큼(gel 100mg당 100µl) 추가한 후 column 튜브에 옮겨 18000rpm에 1분간 원심분리하였다. 그리고 하층액을 제거하고 다시 QG buffer를 500µl 추가한 뒤 13000rpm에 1분간 원심분리하고 하층액을 제거하였다. 그리고 PE buffer 500µl를 추가하여 13000rpm에 1분간 원심분리한 후 하층액을 제거하고 새로운 튜브에 옮긴 뒤 Elution buffer를 이용하여 membrane 내 DNA를 추출하였다. gel 내 DNA를 추출한 후 전기영동을 수행하여 DNA 밴드를 다시 확인하였다.

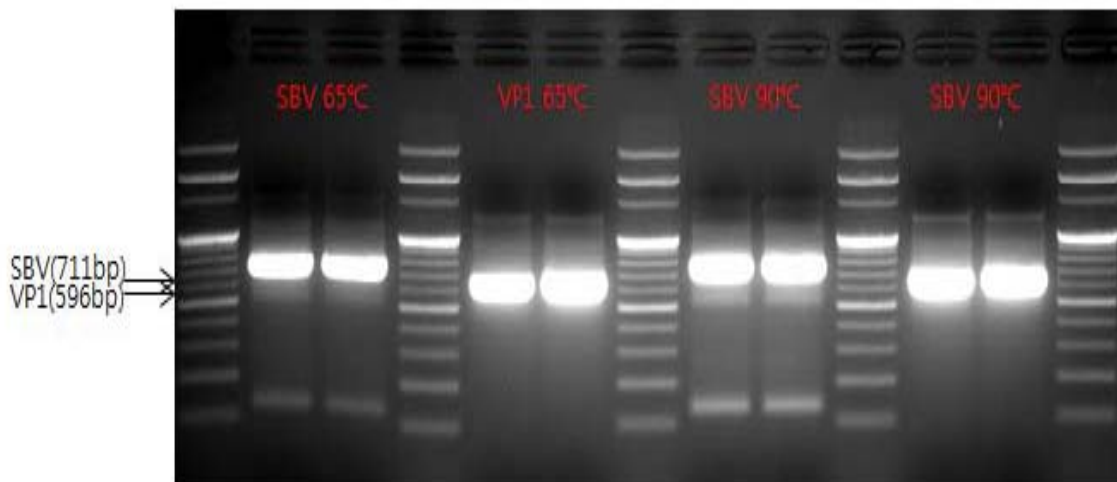


그림 10-5. gel 내 DNA 추출 전 T7SBV, T7VP1 DNA 증폭산물로 전기영동



그림 10-6. gel 내 dsSBV, dsVP1 DNA를 추출한 후 전기영동을 수행한 사진

라. dsSBV, dsVP1 유전자 클로닝

TOPcloner™ TA Kit을 이용하여 cDNA 합성조건에 따라 나는 실험군(SBV 65°C, VP1 65°C, SBV 90°C, VP1 90°C)의 Ligation을 수행하였다. 앞서 추출한 DNA 4 μ l에 pTOP TAV2 1 μ l, 6X TOP cloner buffer 1 μ l를 넣고 실온에 1시간동안 반응시켰다.

그리고 Transformation을 수행하기 위하여 HIT competent cells(RBC, RH617) 30 μ l와 ligation 혼합액을 넣고 ice에서 20~30 분간 반응시킨 후 40°C에서 5 분간 열쇼크(heat shock)를 주었다. 그리고 5분간 ice 상에 식힌 후 SOC media 200 μ l/mlf 넣고 37°C에서 1시간 동안 200~220rpm으로 진탕배양하였다. 그리고 LB agar배지(50 μ g ampicillin 첨가)에 도말 후 37°C에서 15시간 배양하였다. 배지 내 colony를 확인 한 후에 실험군 SBV 65°C는 9개의 colony, 실험군 VP1 65°C는 7개의 colony, 실험군 SBV 90°C는 7개의 colony, 실험군 VP1 90°C는 9개의 colony를 선택하여 플로닝이 되었는지를 확인하는 PCR을 수행하였다. 선택한 colony는 멸균한 이쑤시개를 이용하여 선발하였고 새로운 배지에 계대배양한 후 남은 양을 DNA 추출을 위해 사용하였다. 세포 내 DNA를 추출하기 위하여 95°C에서 10분간 처리하였으며 이를 DNA 샘플로 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR을 위해 Hot taq PCR Kit(Enzynomics)를 사용하였으며 Primer는 M13F, M13R(10 μ mol)이며 각각 1 μ l, DNA샘플을 3 μ l, D.W.를 15 μ l 넣고 총 양이 20 μ l가 되도록 조성한 후 진행하였다.

PCR 수행 후 증폭산물을 agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다. 증폭이 확인된 colony는 대량 배양을 위하여 LB broth 배지 10ml에 접종하였고 15시간 동안 배양하였다. 대량 배양

된 세포는 원심분리(8000rpm, 2분)를 이용하여 배지를 제거한 후에 AccuPrep NanopPlus Plasmid mini Extraction Kit(Bio-Neer, K-3111)을 이용하여 타겟유전자가 클로닝된 Plasmid DNA를 추출하였다. DNA 추출을 위해 kit 내 설명서에 따라 수거한 세포 pellet에 1번 buffer 250 μ l 첨가하고 2번 buffer 250 μ l 첨가하였다. 3~4회 흔들어준 후에 3번 buffer 350 μ l 첨가하였으며 13000rpm에 1분간 원심분리하여 변성된 단백질 및 linear DNA를 제거하였다. Plasmid DNA가 포함된 상층액을 DNA 추출용 column tube에 옮긴 뒤 13000rpm에서 1분 동안 원심분리하였다. 하층액을 제거한 후에 4번 buffer를 700 μ l 분주하고 다시 13000rpm에서 1분간 원심분리 한 후 하층액을 제거하였다. 그리고 50 μ l Elution buffer를 이용하여 Plasmid DNA를 추출하였다. 다음 실험을 위하여 -20 $^{\circ}$ C 상에 보관하였다.

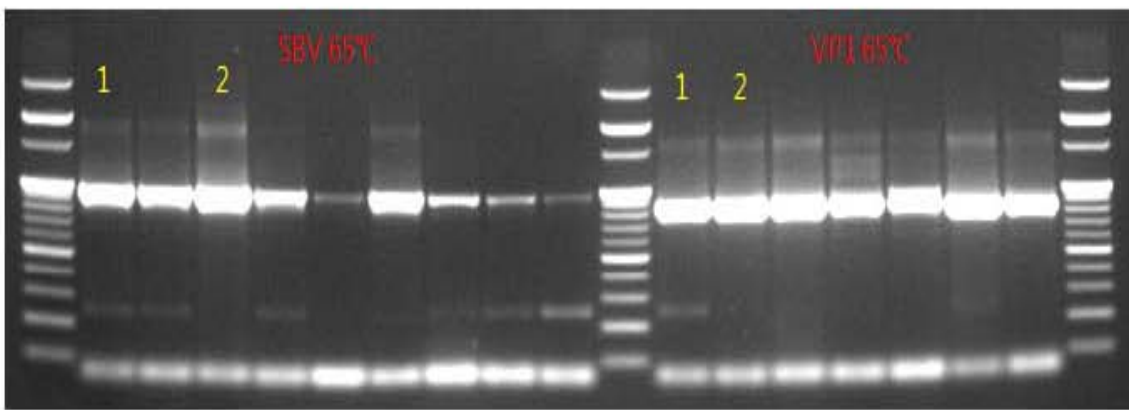


그림 10-7. 실험군 SBV 65 $^{\circ}$ C, 실험군 VP1 65 $^{\circ}$ C의 DNA 클론인 Plasmid DNA의 PCR 증폭산물 전기영동

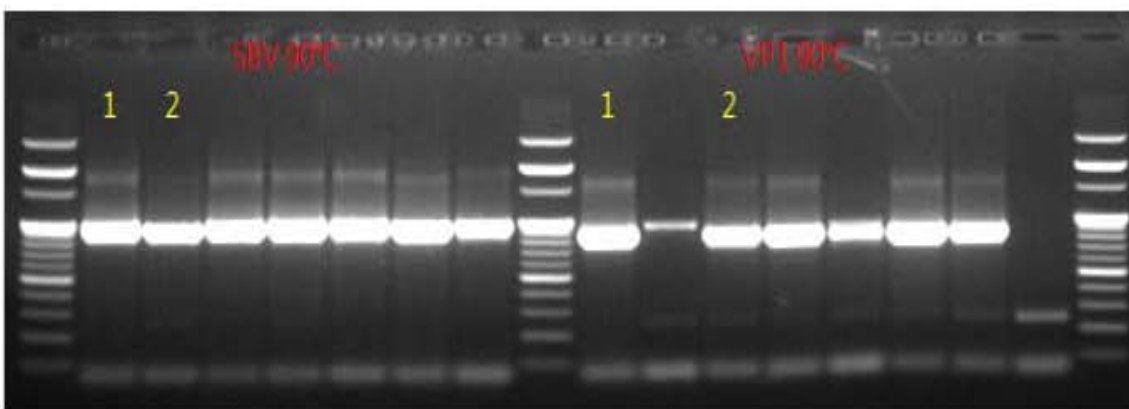



그림 10-8. 실험군 SBV 90 $^{\circ}$ C, 실험군 VP1 90 $^{\circ}$ C의 DNA 클론인 Plasmid DNA의 PCR 증폭산물 전기영동

따. dsRNA (dsSBV) 유전자 시퀀싱 분석

앞서 클로닝한 dsSBV 유전자의 시퀀싱분석을 (주)제노텍에 의뢰하였으며 서열분석 결과를 기본 유전자 서열 검색 시스템인 BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)를 이용하여 검색하였다. 그 결과, 클로닝한 dsSBV 유전자가 한국형 Sacbrood virus complete genome과 99% 일치함을 확인하였다.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ322114.1	Sacbrood virus strain Korean, complete genome	1282	1282	65%	0.0	99%	
AF469803.1	Sacbrood virus polyprotein gene, complete cds	1194	1194	65%	0.0	97%	
AY216794.1	Sacbrood virus strain HaTay polyprotein (pol) gene, partial cds	1103	1103	59%	0.0	98%	
AY311387.1	Sacbrood virus isolate Hai Hung polyprotein (pol) gene, partial cds	1092	1092	59%	0.0	97%	
HQ616655.1	Sacbrood virus isolate Hanoi-41 polyprotein gene, partial cds	1048	1048	59%	0.0	96%	
HQ616656.1	Sacbrood virus isolate Hoabinh-88 polyprotein gene, partial cds	1031	1031	59%	0.0	96%	
HM237361.1	Sacbrood virus CSBV-LN/China/2009, complete genome	1031	1031	65%	0.0	93%	
HQ616654.1	Sacbrood virus isolate Haqiang-37 polyprotein gene, partial cds	1026	1026	59%	0.0	95%	
AF284660.1	Sacbrood virus isolate India polyprotein gene, partial cds	953	953	56%	0.0	94%	
AF284658.1	Sacbrood virus isolate Nepal 1 polyprotein gene, partial cds	898	898	56%	0.0	93%	
JQ267668.1	Sacbrood virus isolate Kor11 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267665.1	Sacbrood virus isolate Kor8 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267664.1	Sacbrood virus isolate Kor7 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267662.1	Sacbrood virus isolate Kor5 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267661.1	Sacbrood virus isolate Kor4 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267660.1	Sacbrood virus isolate Kor3 polyprotein gene, partial cds	891	891	44%	0.0	99%	
JQ267671.1	Sacbrood virus isolate Kor17 polyprotein gene, partial cds	885	885	44%	0.0	99%	
JQ267674.1	Sacbrood virus isolate Kor20 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267673.1	Sacbrood virus isolate Kor19 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267667.1	Sacbrood virus isolate Kor10 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267666.1	Sacbrood virus isolate Kor9 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267663.1	Sacbrood virus isolate Kor6 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267659.1	Sacbrood virus isolate Kor2 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
JQ267658.1	Sacbrood virus isolate Kor1 polyprotein gene, partial cds	880	880	44%	0.0	99%	
AF092924.1	Sacbrood virus complete genome	878	878	65%	0.0	89%	


```

> gb|HQ322114.1 Sacbrood virus strain Korean, complete genome
Length=8792

Score = 1288 bits (697), Expect = 0.0
Identities = 707/712 (99%), Gaps = 0/712 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 118 ACTCAACACGCGCTGGATTGCGACCAATAGAGAAGAACTTGTACATTCCAAATATACTTC 177
      |||
Sbjct 6313 ACTCAACACGCGCTGGATTGCGACCAATAGAGAAGAACTTGTACATTCCAAATATACTTC 6254

Query 178 CCACTGCCATCACTAAACCTGCAGCTGCCACTATCAAAGTTCTGTAATTCGCAAACGAAT 237
      |||
Sbjct 6253 CCACTGCCATCACTAAACCTGCAGCTGCCACTATCAAAGTTCTGTAATTCGCAAACGAAT 6194

Query 238 CACCTACTCTCTGATACCAACTATCCATTGTGATATTATGAACTTCTAGAGCTAAATCTT 297
      |||
Sbjct 6193 CACCTACTCTCTGATACCAACTATCCATTGTGATATTATGAACTTCTAGAGCTAAATCTT 6134

Query 298 CATTAGCTCTCATCCAGTGGGGTTGGAAAATTCGTGGAACCTCGTTTCCTATAATAATCTT 357
      |||
Sbjct 6133 CATTAGCTCTCATCCAGTGGGGTTGGAAAATTCGTGGAACCTCGTTTCCTATAATAATCTT 6074

Query 358 GAGAATGCTGATTATTAATGAAACCTAACAAATAGGACTGAATTCATCTTCTTTTCCT 417
      |||
Sbjct 6073 GAGAATGCTGATTATTAATGAAACCTAACAAATAGGACTGAATTCATCTTCTTTTCCT 6014

Query 418 CCTTATACCGTTGGGCAAAACTTTTAAATGCTTCCATATCAGAAAAGTAACAATCTGATG 477
      |||
Sbjct 6013 CCTTATACCGTTGGGCAAAACTTTTAAATGCTTCCATATCAGAAAAGTAACAATCTGATG 5954

Query 478 TACACGGCAATTCGGGCACCTCTACCATAGTTCCCCCGTTGGGTACATTATAACCCCCAT 537
      |||
Sbjct 5953 TACACGGCAATTCGGGCACCTCTACCATAGTTCCCCCGTTGGGTACATTATAACCCCCAT 5894

Query 538 CACGATAAGACACATGATGCAAAGCTCCCCCAATAATATATGAAGGCAAGGTATATTAG 597
      |||
Sbjct 5893 CACGATAAGACACATGATGCAAAGCTCCCCCAATAATATATGAAGGCAAGGTATATTAG 5834

Query 598 TAAITTCCTCTCCCGCACCAGAGAGCGGCCACATCTTCTCAAATCAAAGTTACAA 657
      |||
Sbjct 5833 TAAITTCCTCTCCCGCATCAGAGAGCGGCCACATCTTCTCAAATCAAAGTTACAA 5774

```

그림 10-10. 기본 유전자 서열 검색 시스템인 BLAST를 이용한 SBV 65C-2 유전자 서열 검색

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ322114.1	Sacbrood virus strain Korean, complete genome	1298	1298	72%	0.0	99%	
AF369603.1	Sacbrood virus polyprotein gene, complete cds	1210	1210	72%	0.0	97%	
AY311387.1	Sacbrood virus isolate Hai Hung polyprotein (pol) gene, partial cds	1101	1101	65%	0.0	97%	
AY248794.1	Sacbrood virus strain HaTay polyprotein (pol) gene, partial cds	1101	1101	65%	0.0	97%	
HQ616653.1	Sacbrood virus isolate Hanoi-41 polyprotein gene, partial cds	1057	1057	65%	0.0	96%	
HQ616656.1	Sacbrood virus isolate Hoabinh-88 polyprotein gene, partial cds	1040	1040	65%	0.0	96%	
HQ616654.1	Sacbrood virus isolate Hagiang-37 polyprotein gene, partial cds	1035	1035	65%	0.0	96%	
HM237361.1	Sacbrood virus CSBV-LN/China/2009, complete genome	1035	1035	71%	0.0	93%	
AF384560.1	Sacbrood virus isolate India polyprotein gene, partial cds	963	963	62%	0.0	95%	
AF204636.1	Sacbrood virus isolate Nepal 1 polyprotein gene, partial cds	907	907	62%	0.0	93%	
JQ267668.1	Sacbrood virus isolate Kor11 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267665.1	Sacbrood virus isolate Kor8 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267664.1	Sacbrood virus isolate Kor7 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267661.1	Sacbrood virus isolate Kor4 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267660.1	Sacbrood virus isolate Kor3 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267671.1	Sacbrood virus isolate Kor17 polyprotein gene, partial cds	894	894	49%	0.0	99%	
JQ267662.1	Sacbrood virus isolate Kor5 polyprotein gene, partial cds	894	894	49%	0.0	99%	
AF092924.1	Sacbrood virus complete genome	894	894	72%	0.0	89%	G
JQ267674.1	Sacbrood virus isolate Kor20 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267673.1	Sacbrood virus isolate Kor19 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267667.1	Sacbrood virus isolate Kor10 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267666.1	Sacbrood virus isolate Kor9 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267663.1	Sacbrood virus isolate Kor6 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267659.1	Sacbrood virus isolate Kor2 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267669.1	Sacbrood virus isolate Kor1 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	

```

>|gb|HQ322114.1| Sacbrood virus strain Korean, complete genome
Length=8792

Score = 1299 bits (703), Expect = 0.0
Identities = 709/712 (99%), Gaps = 0/712 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 121 CCTTCGATGAGTGAGAGAACAGCGGAATTATTACGGATGACAGGGGCCTTGGTTGATATG 180
      |||||
Sbjct 5602 CCTTCTATGGGTGAGAGAACAGCGGAATTATTACGGATGACAGGGGCCTTGGTTGATATG 5661

Query 181 AGCGAATACACGGTGCGAGAATTGCAACATGTAGTTACCCAGATAGATGATCCCTTTGAG 240
      |||||
Sbjct 5662 AGCGAATACACGGTGCGAGAATTGCAACATGTAGTTACCCAGATAGATGATCCCTTTGAG 5721

Query 241 TCAGGGGATGAAGACGACGAAAGTTGGTACTAGTAAAATACACTGGCGTGATATTGTAAC 300
      |||||
Sbjct 5722 TCAGGGGATGAAGACGACGAAAGTTGGTACTAGTAAAATACACTGGCGTGATATTGTAAC 5781

Query 301 ITTGATTTTGGAGGAAGATGTGGCGGCTCTCTGATGCGGGGAGGGAAATTACTAATATA 360
      |||||
Sbjct 5782 ITTGATTTTGGAGGAAGATGTGGCGGCTCTCTGATGCGGGGAGGGAAATTACTAATATA 5841

Query 361 CCTTGCCCTTATATATTATTGGGGGAGCTTTGCATCATGTGTCTTATCGTGATGGGGGT 420
      |||||
Sbjct 5842 CCTTGCCCTTATATATTATTGGGGGAGCTTTGCATCATGTGTCTTATCGTGATGGGGGT 5901

Query 421 TATAATGTACCCAACGGGGAACTATGGTGAGAGTGCCGGAATTGCCGTGTACATCAGAT 480
      |||||
Sbjct 5902 TATAATGTACCCAACGGGGAACTATGGTGAGAGTGCCGGAATTGCCGTGTACATCAGAT 5961

Query 481 TGTTACTTTTCTGATATGGAAGCATTAAAAAGTTTTGCCCAACGGTATAAGGAGGAAAAG 540
      |||||
Sbjct 5962 TGTTACTTTTCTGATATGGAAGCATTAAAAAGTTTTGCCCAACGGTATAAGGAGGAAAAG 6021

Query 541 AAGATTGAAATTCAGTCCTAATTTGTTAGTTTTTCATTAAATAATCAGCATTCTCAAGATTAT 600
      |||||
Sbjct 6022 AAGATTGAAATTCAGTCCTAATTTGTTAGTTTTTCATTAAATAATCAGCATTCTCAAGATTAT 6081

Query 601 TATAGGAAACGAGTTCACGAAATTTTCCAACCCCACTGGATGAGAGCTAATGAAGATTTA 660
      |||||
Sbjct 6082 TATAGGAAACGAGTTCACGAAATTTTCCAACCCCACTGGATGAGAGCTAATGAAGATTTA 6141

```

그림 10-11. 기본 유전자 서열 검색 시스템인 BLAST를 이용한 SBV 90C-1 유전자 서열 검색

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ322114.1	Sacbrood virus strain Korean, complete genome	1299	1299	71%	0.0	99%	
AF469603.1	Sacbrood virus polyprotein gene, complete cds	1210	1210	71%	0.0	97%	
AY211387.1	Sacbrood virus isolate Hai Hung polyprotein (pol) gene, partial cds	1101	1101	65%	0.0	97%	
AY216794.1	Sacbrood virus strain HaTay polyprotein (pol) gene, partial cds	1101	1101	65%	0.0	97%	
HQ616655.1	Sacbrood virus isolate Hanoi-41 polyprotein gene, partial cds	1057	1057	65%	0.0	96%	
HQ616656.1	Sacbrood virus isolate Hoabinh-88 polyprotein gene, partial cds	1040	1040	65%	0.0	96%	
HQ616654.1	Sacbrood virus isolate Haqiang-37 polyprotein gene, partial cds	1035	1035	65%	0.0	96%	
HM272861.1	Sacbrood virus CSBV-LN/China/2009, complete genome	1035	1035	71%	0.0	93%	
AF284660.1	Sacbrood virus isolate India polyprotein gene, partial cds	963	963	62%	0.0	95%	
AF284658.1	Sacbrood virus isolate Nepal 1 polyprotein gene, partial cds	907	907	62%	0.0	93%	
JQ267668.1	Sacbrood virus isolate Kor11 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267665.1	Sacbrood virus isolate Kor8 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267664.1	Sacbrood virus isolate Kor7 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267661.1	Sacbrood virus isolate Kor4 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267660.1	Sacbrood virus isolate Kor3 polyprotein gene, partial cds	900	900	49%	0.0	99%	
JQ267671.1	Sacbrood virus isolate Kor17 polyprotein gene, partial cds	894	894	49%	0.0	99%	
JQ267662.1	Sacbrood virus isolate Kor5 polyprotein gene, partial cds	894	894	49%	0.0	99%	
AF092924.1	Sacbrood virus complete genome	894	894	71%	0.0	89%	G
JQ267674.1	Sacbrood virus isolate Kor20 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267673.1	Sacbrood virus isolate Kor19 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267667.1	Sacbrood virus isolate Kor10 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267666.1	Sacbrood virus isolate Kor9 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267663.1	Sacbrood virus isolate Kor6 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267659.1	Sacbrood virus isolate Kor2 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	
JQ267658.1	Sacbrood virus isolate Kor1 polyprotein gene, partial cds	889	889	49%	0.0	99%	


```

>|gb|HQ322114.1| Sacbrood virus strain Korean, complete genome
Length=8792

Score = 1299 bits (703), Expect = 0.0
Identities = 709/712 (99%), Gaps = 0/712 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 118 ACTCAACACGCGCTGGATTTCGCACCAATAGAGAAGAAGTGTACATTCCAAATATACTTC 177
      |||
Sbjct 6313 ACTCAACACGCGCTGGATTTCGCACCAATAGAGAAGAAGTGTACATTCCAAATATACTTC 6254

Query 178 CCACTGCCATCACTAAACCTGCAGCTGCCACTATCAAAGTTCGTAAATTCGCAAACGAAT 237
      |||
Sbjct 6253 CCACTGCCATCACTAAACCTGCAGCTGCCACTATCAAAGTTCGTAAATTCGCAAACGAAT 6194

Query 238 CACCTACTCTCTGATACCAACTATCCATTGTGATATTATGAACTTCTAGAGCTAAATCTT 297
      |||
Sbjct 6193 CACCTACTCTCTGATACCAACTATCCATTGTGATATTATGAACTTCTAGAGCTAAATCTT 6134

Query 298 CATTAGCTCTCATCCAGTGGGGTTGGAAAATTCGTGGAACCTCGTTTCCATAATAATCTT 357
      |||
Sbjct 6133 CATTAGCTCTCATCCAGTGGGGTTGGAAAATTCGTGGAACCTCGTTTCCATAATAATCTT 6074

Query 358 GAGAATGCTGATTATTAATGAAACCTAACAAATAGGACTGAAATTCATCTTCTTTTCTT 417
      |||
Sbjct 6073 GAGAATGCTGATTATTAATGAAACCTAACAAATAGGACTGAAATTCATCTTCTTTTCTT 6014

Query 418 CCTTATACCGTTGGGCAAAACTTTTAAATGCTTCCATATCAGAAAAGTAACAATCTGATG 477
      |||
Sbjct 6013 CCTTATACCGTTGGGCAAAACTTTTAAATGCTTCCATATCAGAAAAGTAACAATCTGATG 5954

Query 478 TACACGGCAATTCGGGCACCTCTCACCATAGTTCCCCCGTTGGGTACATTATAACCCCCAT 537
      |||
Sbjct 5953 TACACGGCAATTCGGGCACCTCTCACCATAGTTCCCCCGTTGGGTACATTATAACCCCCAT 5894

Query 538 CACGATAAGACACATGATGCAAAGCTCCCCCAATAATATATGAAGGCAAGGTATATTAG 597
      |||
Sbjct 5893 CACGATAAGACACATGATGCAAAGCTCCCCCAATAATATATGAAGGCAAGGTATATTAG 5834

Query 598 TAATTTCCCTCTCCCGCATCAGAGAGCGGCCACATCTTCTCAAATCAAAGTTACAA 657
      |||
Sbjct 5833 TAATTTCCCTCTCCCGCATCAGAGAGCGGCCACATCTTCTCAAATCAAAGTTACAA 5774

```

그림 10-12. 기본 유전자 서열 검색 시스템인 BLAST를 이용한 SBV 90C-2 유전자 서열 검색

바. T7 RNA polymerase를 이용한 대량의 single strand RNA 합성

dsDNA(PCR 증폭산물 또는 linear plasmid)를 주형으로 promoter down stream 서열을 전사하여 ssRNA를 합성하였다. sense 및 antisense RNA와 annealing한 dsRNA를 siRNAIII나 sense 및 sense-DICER로 절단하여 siRNA를 제작하였다. siRNA 합성을 위해 in vitro Transcription T7 kit(for siRNA synthesis)(TaKaRa, 6140)를 사용하였으며 키트 매뉴얼에 따라 10 μ l의 ZNTP/CAP, 3 μ l의 10X reaction buffer, 1 μ g의 linear template DNA(plasmid DNA 또는 PCR 증폭산물), 2 μ l의 T7 Enzyme Mix 그리고 30 μ l의 Nuclease-free water를 넣고 조성한 후 30 μ l의 LiCl solution을 첨가하고 30분 간 -20 $^{\circ}$ C 상에서 침전시킨 후에 원심분리를 이용하여 상등액을 제거하였다. 그리고 1 ml의 70% ethanol을 첨가한 후 다시 원심분리하여 상등액을 제거하고 30 μ l의 Elution buffer를 이용하여 RNA를 녹여 다음 실험을 위하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

사. 후보물질 선별을 위한 스크리닝 시스템의 개발

꿀벌에벌레의 실험실내 인공배양을 이용한 낭충봉아부패병 바이러스의 치료제 및 예방약 등에

대한 신속하고 객관적인 효과검증을 위하여 안정적인 꿀벌 애벌레의 인공배양법을 확립하였다.

소비내의 꿀벌 애벌레를 세포배양용 24well plate로 옮긴 후 35℃, 80%의 습도 조건에서 배양하였다. 개량 인공사양액(D-glucose 6%, D-fructose 6%, yeast extract 1%, Grace medium 33%, Royal jelly 50%)을 매일 꿀벌 애벌레에게 100 μ l씩 주어 사양하였다.

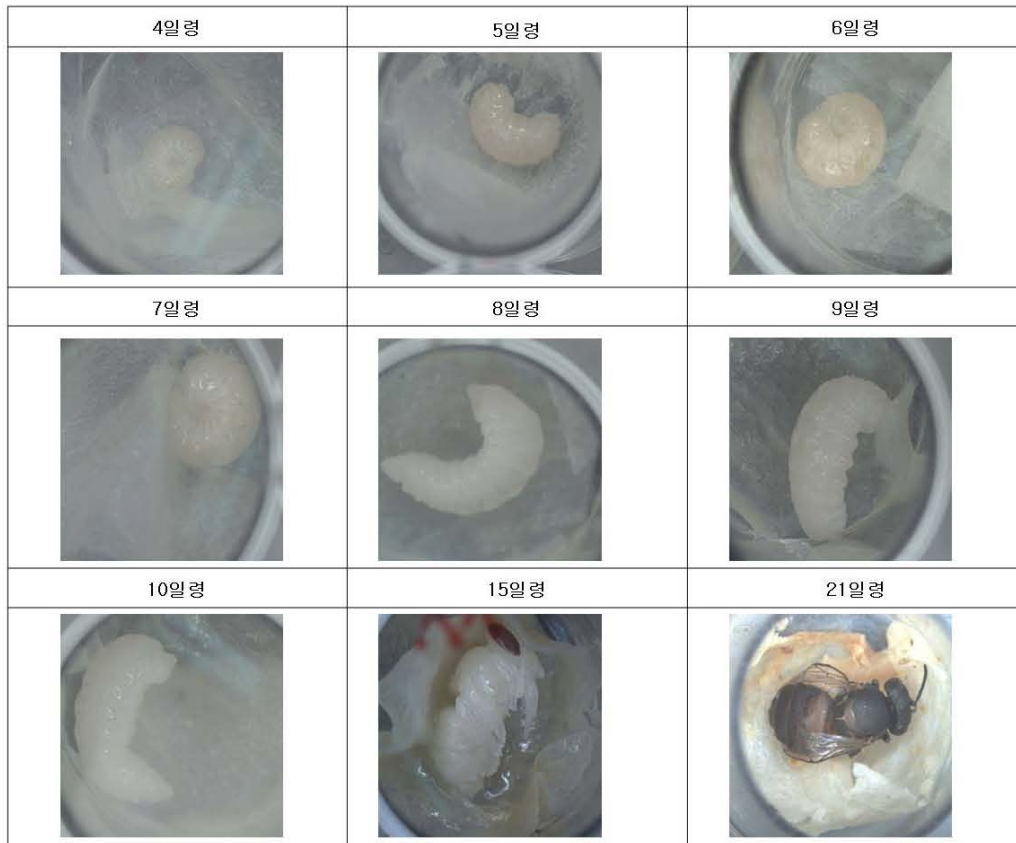


그림 10-13. 꿀벌 애벌레 실험실내 인공배양 일령별 상태

아. 후보 siRNA의 SBV 발현 억제 능력 확인

3~4일령 애벌레를 SBV에 인공감염 시킨 후, 바이러스 감염군 (G9), 비감염군 (G10), SBV1 siRNA 처리군 (G1:예방+감염, G2:감염 +치료, G3:예방+감염 +치료, G4:비감염 +siRNA 처리군) 및 VP1 siRNA 처리군 (G5:예방+감염, G6:감염+치료, G7:예방+감염 +치료, G8:비감염 +siRNA 처리군)에 따른 애벌레 생존율을 확인하였다.

그 결과 SBV1 및 VP1 siRNA 처리군은 비처리 감염군에 비해 높은 생존율을 확인할 수 있었으며, 이는 낭충봉아부패병 감염군에 대해서도 바이러스 감염군인 Group10에 비해 SBV1 및 VP1 siRNA 처리군에서 생존율이 높아질 것이 확인되었다.

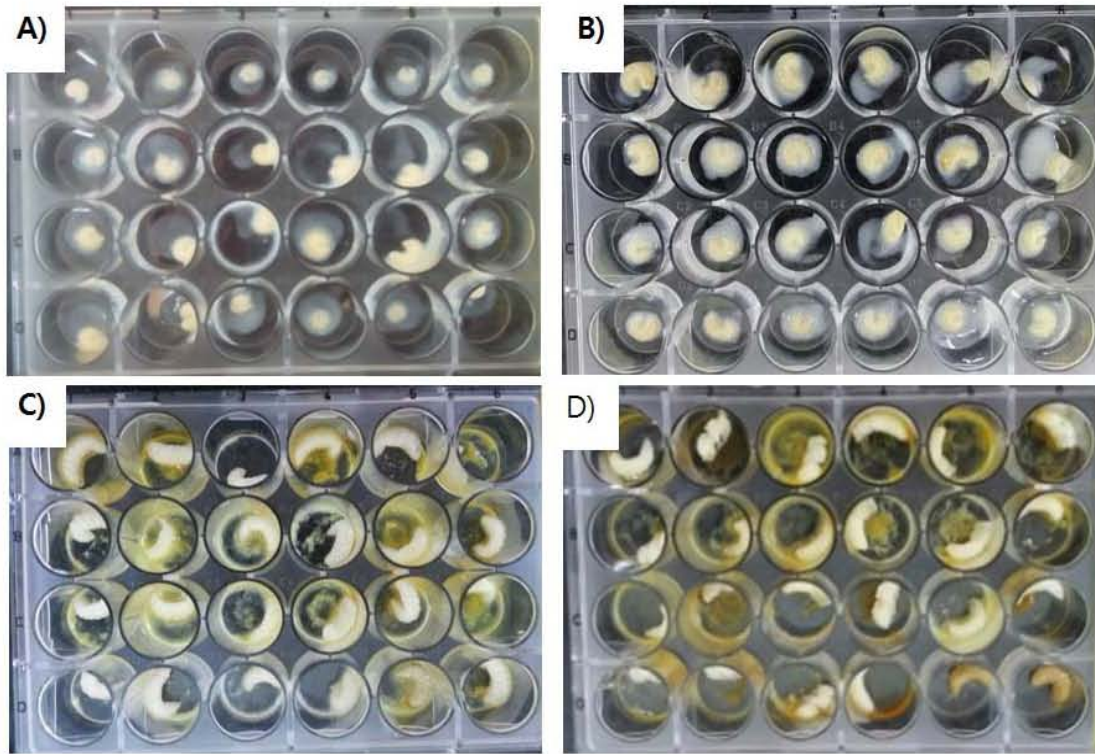
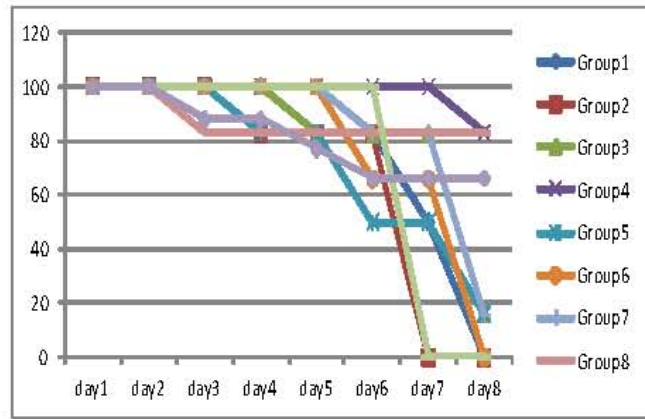


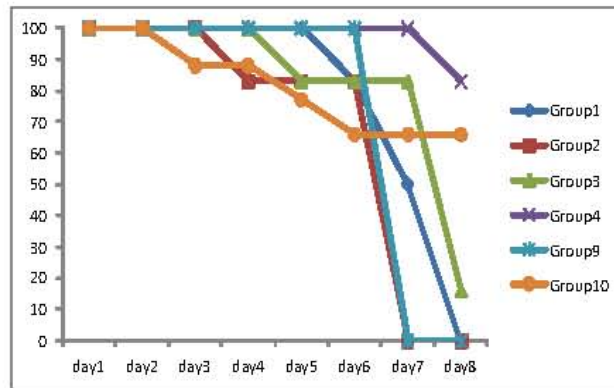
그림 10-14. 에볼라 배양 스크리닝 시스템을 이용한 낭충봉아부패병의 인공감염 에볼라 일령별 상태

(A)



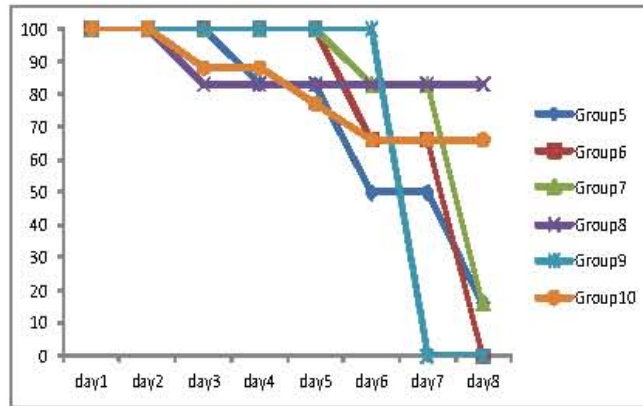
실험군 \ 생존율(%)	day1	day2	day3	day4	day5	day6	day7	day8
Group1	100	100	100	100	100	83	50	0
Group2	100	100	100	83	83	83	0	0
Group3	100	100	100	100	83	83	83	16
Group4	100	100	100	100	100	100	100	83
Group5	100	100	100	83	83	50	50	16
Group6	100	100	100	100	100	66	66	0
Group7	100	100	100	100	100	83	83	16
Group8	100	100	83	83	83	83	83	83
Group9	100	100	100	100	100	100	0	0
Group10	100	100	88	88	77	66	66	66

(B)



실험군 \ 생존율(%)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Group1	100	100	100	100	100	83	50	0
Group2	100	100	100	83	83	83	0	0
Group3	100	100	100	100	83	83	83	16
Group4	100	100	100	100	100	100	100	83
Group9	100	100	100	100	100	100	0	0
Group10	100	100	88	88	77	66	66	66

(C)



실험군 \ 생존율 (%)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
Group5	100	100	100	83	83	50	50	16
Group6	100	100	100	100	100	66	66	0
Group7	100	100	100	100	100	83	83	16
Group8	100	100	83	83	83	83	83	83
Group9	100	100	100	100	100	100	0	0
Group10	100	100	88	88	77	66	66	66

그림 10-15. 후보 siRNA의 SBV 발현 억제 능력 확인을 위한 siRNA 처리에 따른 에벌레 생존율 확인 실험 결과

그래프(A), SBV1 siRNA 처리군 에벌레 생존율 그래프(B) ;G1:예방+감염, G2:감염 +치료, G3:예방+감염 +치료, G4:비감염 +siRNA 처리군, VP1 siRNA 처리군 에벌레 생존율 그래프(C);G5:예방+감염, G6:감염+치료, G7:예방+감염 +치료, G8:비감염 +siRNA 처리군

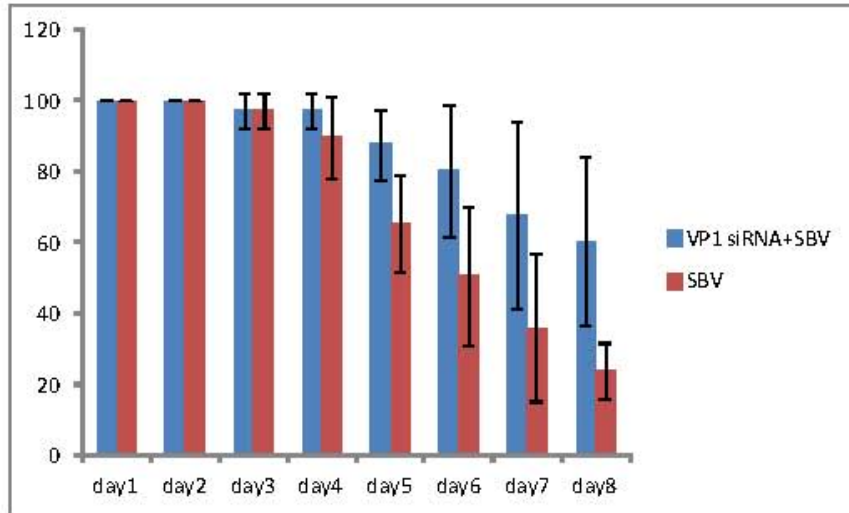


그림 10-16. VP1 siRNA 처리 및 비처리에 따른 예빌레 생존율 확인

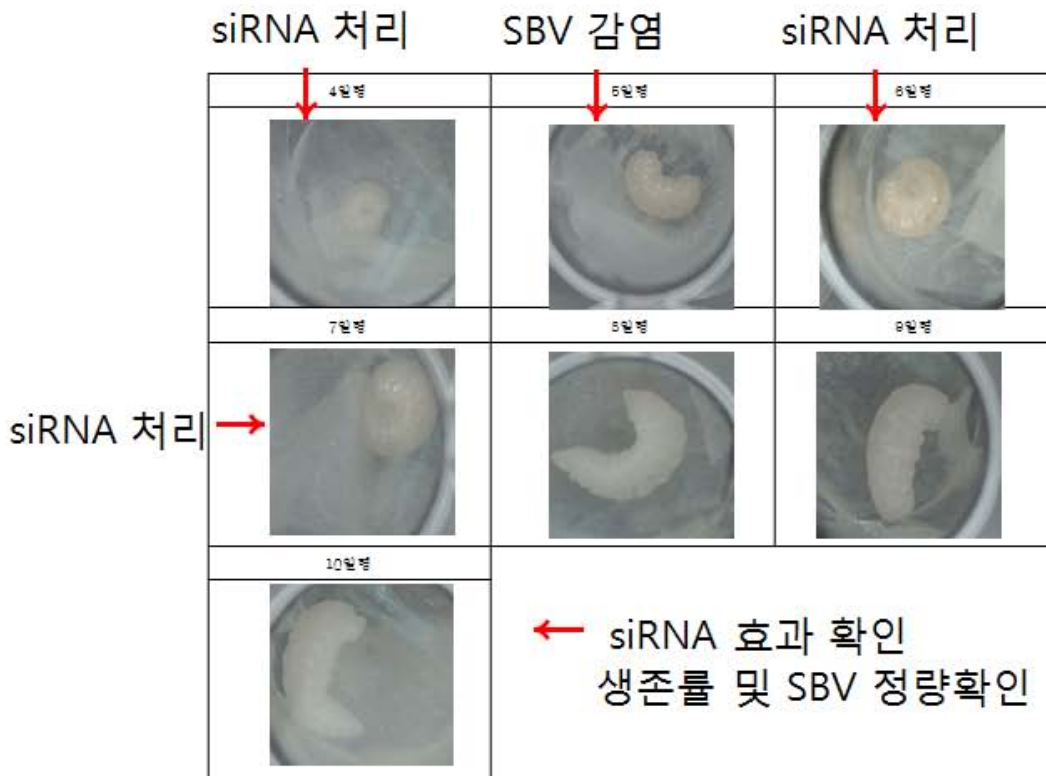


그림 10-17. SBV에 대한 siRNA 효능평가 인공 실험

자. SBV 정량분석을 위한 real-time PCR system

프라이머는 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 특이적인 프라이머 세트를 사용하였다. NCBI Gene bank에 등록되어 있는 한국형 낭충봉아부패병 바이러스(HQ322114)를 낭충봉아부패병 바

이리스(AF092924) 및 중국형 낭충봉아부패병 바이러스(HM237361)와 비교하여 한국형 낭충봉아부패병 바이러스를 특이적으로 진단할 수 있는 프라이머 세트를 설계하고, 일반 PCR을 통해 123bp 크기의 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 유전자 산물이 형성됨을 확인하였다.

한국형 낭충봉아부패병 바이러스 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머 세트는 Bioneer 사(Korea)에 주문 의뢰하여 제작하여 사용하였다(Table 10-4). 프라이머 서열은 높은 상동성을 갖는 낭충봉아부패병 바이러스 사이에서 한국형 낭충봉아부패병만을 특이적이고 신속하게 진단하기 위하여, 한국형 낭충봉아부패병 바이러스가 가지는 특이부분을 증폭하도록 설계된 프라이머이다.

실시간 중합효소 연쇄반응은 One step SYBR®PrimeScript™RT-PCR Kit II(TaKaRa)을 이용하여 수행하였으며 형광리포터는 SYBR Green을 사용하였다. 중합효소 연쇄반응 조건은 42℃에서 45분 동안 역전사(Reverse transcription)반응을 하였고 95℃에서 10분 동안 선변성(Predenaturation)한 후 변성(denaturation)-어닐링(annealing)-중합(polymerization)으로 증폭을 수행하였으며 각 PCR 단계의 시간은 95℃에서 30초, 60℃에서 30초 72℃에서 30초로 진행하였다. 증폭 단계는 40회 반복한 후 증폭산물 확인을 위해 용해곡선 검출과정을 거쳤으며 용해곡선 검출은 65℃에서 95℃로 0.2℃씩 증가시키며 0.1초간 형광시그널을 모니터링하는 조건으로 수행하였다.

(1) 꿀벌 유충 낭충봉아부패병 감염 일별 KSBV 유전자 발현 상대정량

건강한 3~4주령 꿀벌 유충을 24well cell culture plate에 이충한 후 전처리한 SBV 양성 유충 시료와 사양액을 1:1로 희석한 감염시료를 경구투여하여 인공감염을 유도하였다. 그리고 35℃, 습도 80%의 환경에서 인공배양하면서 감염 일별로 실험 유충을 채취하였다. 채취한 꿀벌 유충 내 RNA를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 항존 유전자인 β -actin으로 표준화하여 꿀벌 유충 내 KSBV의 유전자량을 상대정량한 결과(Fig 10-14), 감염 일이 증가할수록 감염시료를 경구투여한 꿀벌 유충 내 KSBV 유전자량이 증가함을 확인할 수 있었다.

(2) 낭충봉아부패병 인공감염 실험 꿀벌 유충 내 KSBV 유전자 발현 절대정량

(가) 낭충봉아부패병 1차감염 실험

SBV 1차 감염 실험을 위하여 건강한 3~4주령 꿀벌 유충을 24well cell culture plate에 이충하였다. 그리고 Control군은 사양액만 사양하고 실험군인 1차 감염 꿀벌유충은 전처리한 SBV 양성 애벌레 시료와 사양액을 1:1로 희석한 감염시료를 경구투여하여 SBV 인공감염을 유도하였다. 8일 간 인공배양한 후 애벌레를 그룹 별로 수거하였다.

대조군인 Control 꿀벌 유충과 실험군인 1차 SBV감염 유충은 10마리 당 1ml의 GTNE buffer로 유제하고 유제액 100ul(유제액 1/10)에서 Total RNA를 추출하였고, 꿀벌 유충 한 마리 당 투여한 감염시료 내 Total RNA를 추출한 후 이를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 각각의 RNA 내 KSBV 발현량을 KSBV 유전자 검량선을 이용하여 절대정량한 후 비교하였다. KSBV 유전자 검량선(Fig 10-8)은 형광 시그널에 따른 PCR 증폭 반복횟수(Cq;quantification cycle)와 유전자 복제본 수(gene copy variation)의 관계를 나타낸 그래프로 순차적으로 희석한 KSBV 유전자를 실시간 중합효소연쇄반응 후 얻어진 Cq값으로 제작하였으며 미지시료 내 KSBV 유전자량의 절대정량이 가능한 그래프이다.

실시간 중합효소 연쇄반응 결과값(Table 10-5)과 그 값을 검량선 상에 대입한 그래프(Fig 10-10)에서 인공감염 유충 내 KSBV 유전자 발현량이 감염시료 내 KSBV 유전자 발현량(copy number) 보다 약 119.5배 높은 것을 보아 인공감염 결과 유충 내에서 낭충봉아부패병 바이러스량이 증식된 것으로 확인되었으며 대조군 애벌레 내에서는 KSBV 유전자가 발현되지 않았다.

(나) 낭충봉아부패병 2차 감염 실험

SBV 2차 감염 실험을 위하여 건강한 3~4주령 꿀벌 유충을 24well cell culture plate에 이충하였다. 그리고 대조군인 Control군은 사양액만 사양하고 실험군인 2차 감염 꿀벌 유충은 전처리한 SBV 1차 감염 유충 시료와 사양액을 1:1로 희석한 감염시료를 꿀벌 유충에 경구투여하여 SBV 인공감염을 유도하였다. 8일 간 인공배양한 후 꿀벌 유충을 그룹 별로 수거하고 각 시료에 위의 실험과 같이 total RNA를 추출한 후 이를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다.

KSBV 유전자 검량선을 이용하여 KSBV 유전자 발현량을 절대정량한 결과, SBV 2차 감염 꿀벌유충 내 KSBV 유전자 발현량이 꿀벌유충에 경구투여한 감염시료 내 KSBV 유전자 발현량 보다 약 770배 높은 것을 보아 인공감염 결과 유충 내에서 낭충봉아부패병 바이러스량이 증식

된 것으로 확인되었으며 대조군 에벌레 내에서는 KSBV 유전자가 발현되지 않았다.

유전자 이름	프라이머 염기서열	서열번호
KSBV-PCR-F	GACCAAGAAGGGAATCAG	서열번호 1
KSBV-PCR-123R	CATCTTCTTTAGCACCAGTATCCA	서열번호 2

표 10-4. Real-time PCR KSBV Primer set

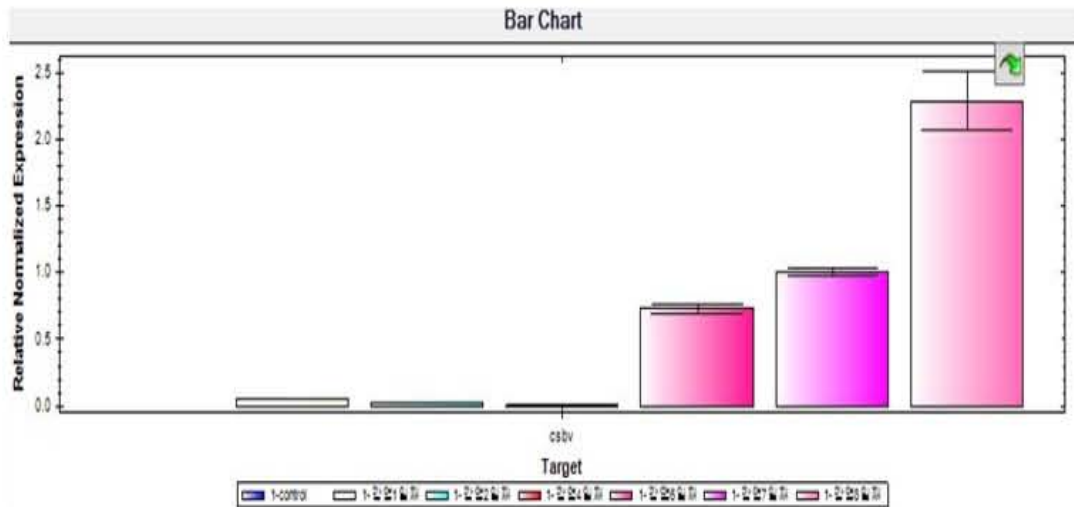


그림 10-18. 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 감염일자별 KSBV 인공감염 꿀벌 유충 내 KSBV 유전자 상대정량 실험결과

표 10-5. SBV 인공감염실험 Real-time PCR 상대정량(항존 유전자: β -actin) 결과

Target	Sample	Ctrl	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
b-actin	0					16,81	0,11315
b-actin	1					18,54	0,00304
b-actin	2					16,64	0,06705
b-actin	4					16,89	0,03703
b-actin	6					17,52	0,00189
b-actin	7					16,42	0,03321
b-actin	8					17,76	0,08712
ksbv	0		0,00000	0,00000	0,00000		
ksbv	1		0,00928	0,00005	0,00005	29,13	0,00704
ksbv	2		0,00516	0,00026	0,00026	28,08	0,02619
ksbv	4		0,00042	0,00006	0,00006	31,93	0,20549
ksbv	6		0,14225	0,00710	0,00710	24,17	0,07201
ksbv	7		0,19110	0,00622	0,00622	22,65	0,00000
ksbv	8		0,43896	0,04516	0,04516	22,78	0,12018

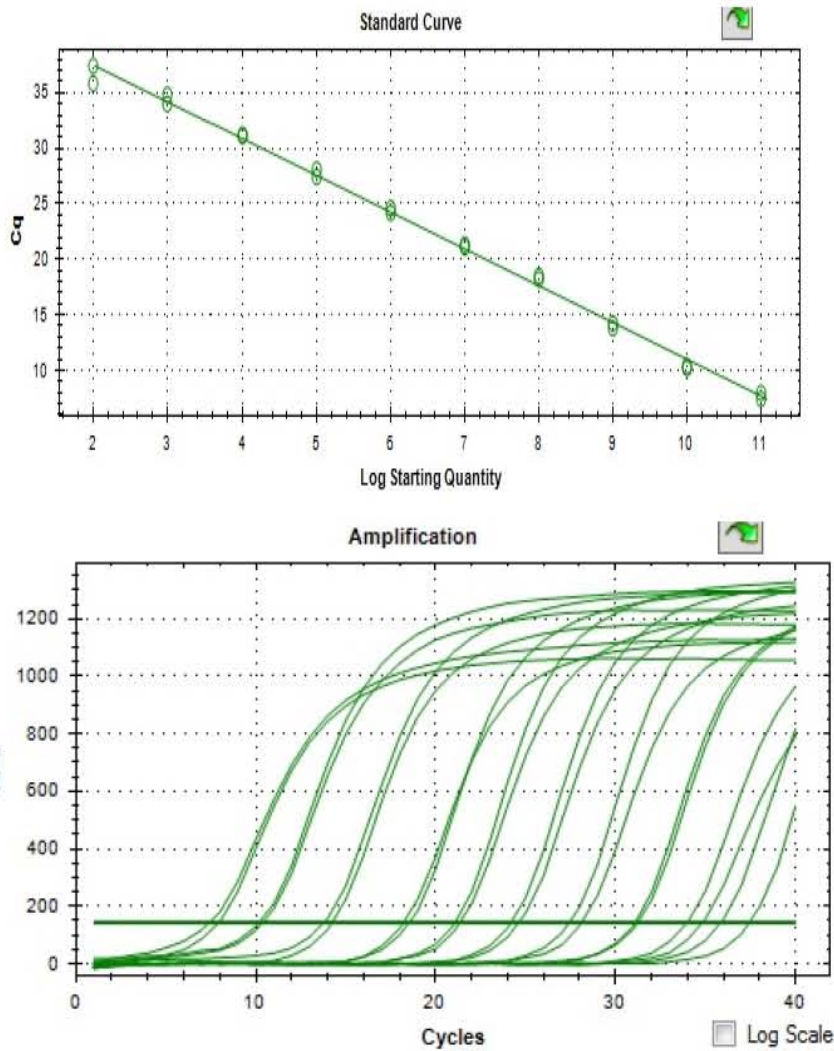


그림 10-19. 인공감염 실험 시료 내 KSBV 유전자 절대정량을 위한 KSBV 검량선 (Standard curve) 제작

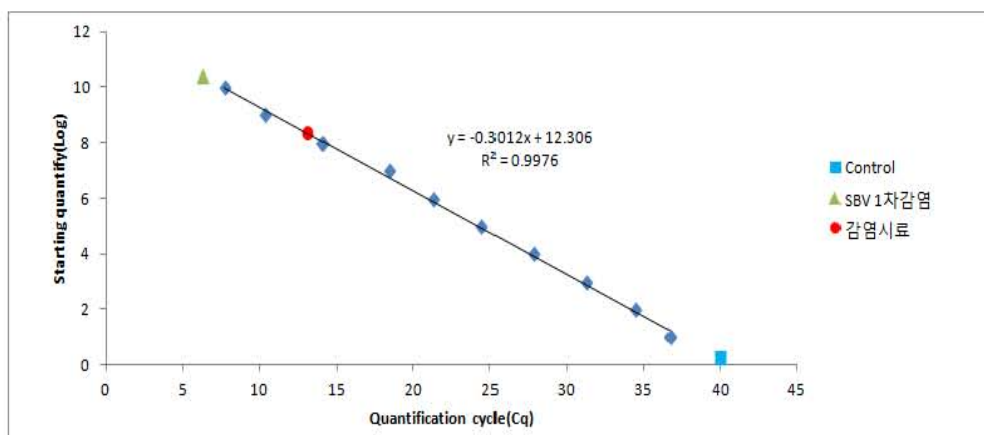


그림 10-20. SBV 1차 인공감염 실험 끝벌유충 내 KSBV 유전자 절대정량 결과

표 10-6. SBV 1차 인공감염 실험 꿀벌유충 내 KSBV 유전자 절대정량 결과

Target	Sample	Cq Mean	SQ(log)	SQ	증폭량
KSBV	Control	40.00	0.26	2	0.0
KSBV	SBV 1차감염	6.27	10.42	26128678468	119.5
KSBV	감염시료	13.17	8.34	218649914	1.0

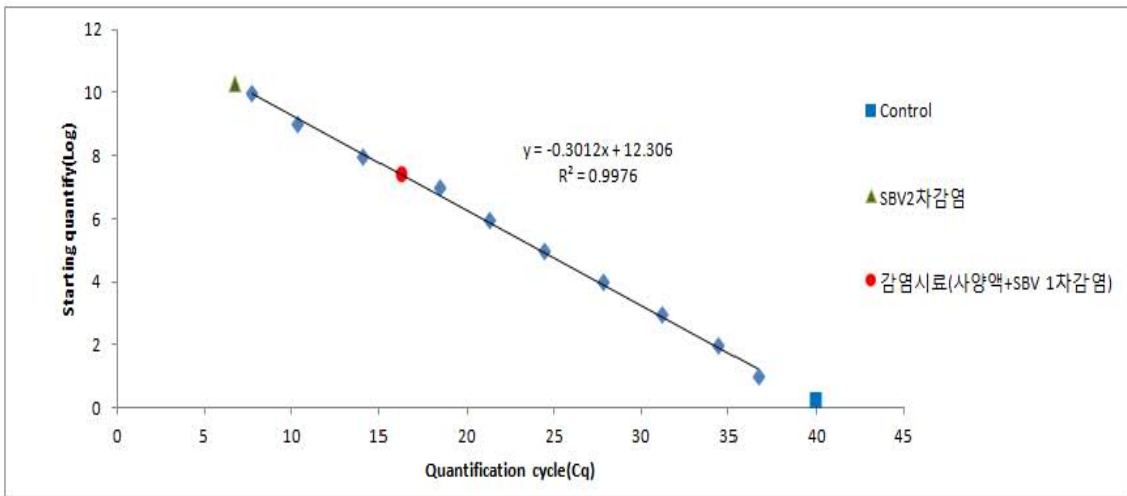


그림 10-21. SBV 2차 인공감염 실험 꿀벌유충 내 KSBV 유전자 절대정량 결과 그래프

표 10-7. SBV 1차 인공감염 실험 꿀벌유충 내 KSBV 유전자 절대정량 결과 자료

Target	Sample	Cq Mean	SQ(log)	SQ	증폭량
KSBV	Control	40.00	0.26	2	0.0
KSBV	SBV2차감염	6.70	10.29	19445949495	770.1
KSBV	감염시료 (사양액+SBV 1차감염)	16.28	7.40	25250002	1.0

(3) SBV에 대한 야외 토종 벌통 내 VP1 si RNA 효능평가 실험

(가) 야외 토종벌통 SBV 인공감염 실험

격리된 공간에 하나의 토종벌통을 하나의 감염군으로 지정하여 SBV 감염 및 SBV 농도가 확인된 꿀벌유충 유제액을 스프레이한 후 일정한 날짜에 꿀벌 시료를 채집하였다. 대조군과 비

교하여 SBV 감염 증가여부를 real-time RT PCR을 이용하여 확인하였다.

(나) SBV에 대한 야외 토종 벌통 내 VP1 si RNA 효능평가

적리된 공간에 하나의 토종벌통을 하나의 감염군으로 지정하여 SBV siRNA를 처리한 후에 SBV 감염 및 SBV 농도가 확인된 꿀벌유충 유계액을 스프레이하였다. 그리고 일정한 날짜에 꿀벌 시료를 채집하여 시료 내 SBV 감염 증가여부를 real-time RT PCR을 이용하여 확인하였다.

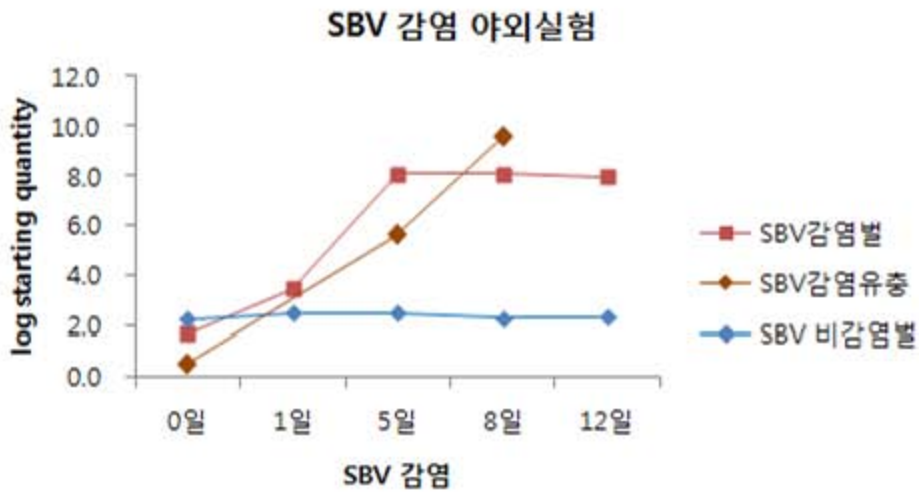


그림 10-22. 야외 토종벌 SBV 인공감염 시료 내 SBV DNA 증폭 그래프

sample	Cq	SQ(log)	SQ
비감염 0일	33.36	2.25	178.56
비감염 1일	32.47	2.52	332.16
비감염 5일	32.41	2.54	344.40
비감염 8일	33.14	2.32	207.38
비감염 12일	32.95	2.37	236.96
감염 0일	35.14	1.71	51.74
감염 1일	29.28	3.48	3046.06
감염 5일	14.05	8.08	120763714.40
감염 8일	14.05	8.08	120442052.30
감염 12일	14.46	7.96	90342087.32
감염유충 0일	39	0.55	3.54
감염유충 5일	22.00	5.68	478900.68
감염유충 8일	9.09	9.58	3789147501.93

표 10-8. 야외 토종벌 SBV 인공감염 시료 내 SBV Real-time PCR 결과

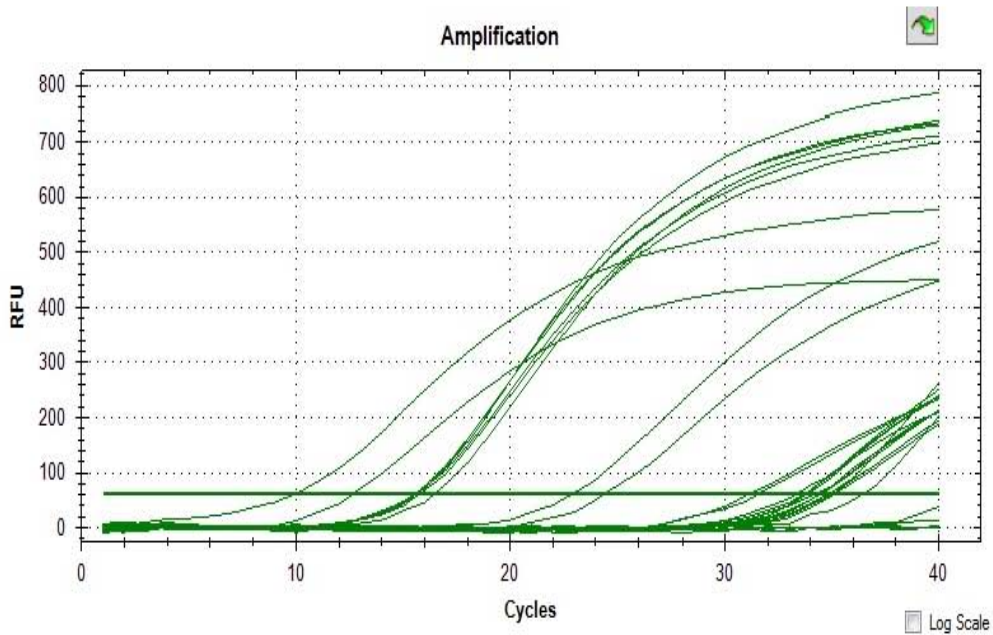


그림 10-23. 야외 토종벌 SBV 인공감염 시료 내 SBV DNA 증폭 그래프

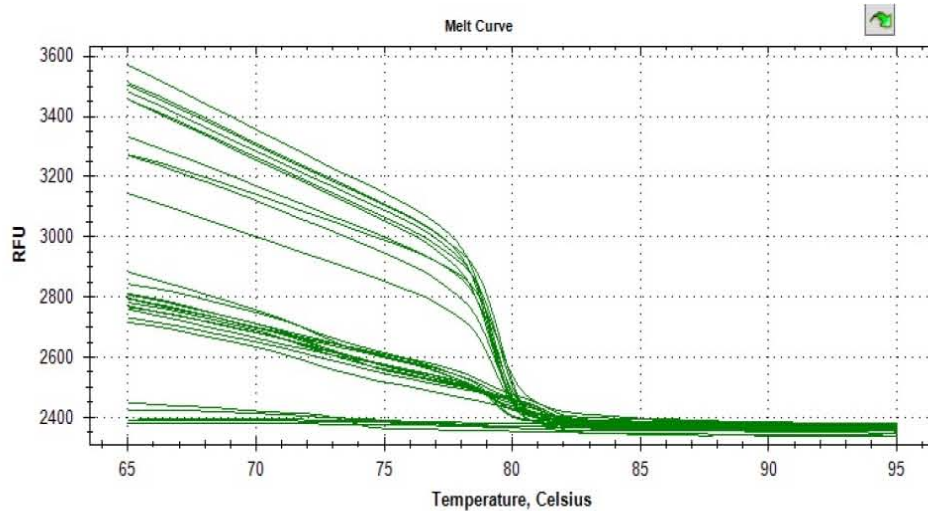


그림 10-24. 아외 토종별 SBV 인공감염 시료 내 DNA melt curve

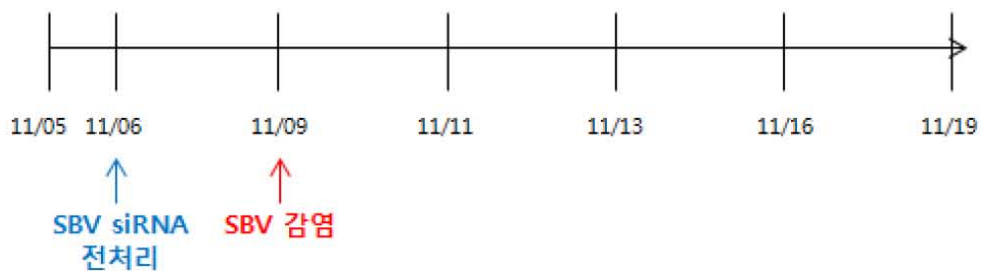


그림 10-25. SBV에 대한 si RNA 효능평가실험(전처리)

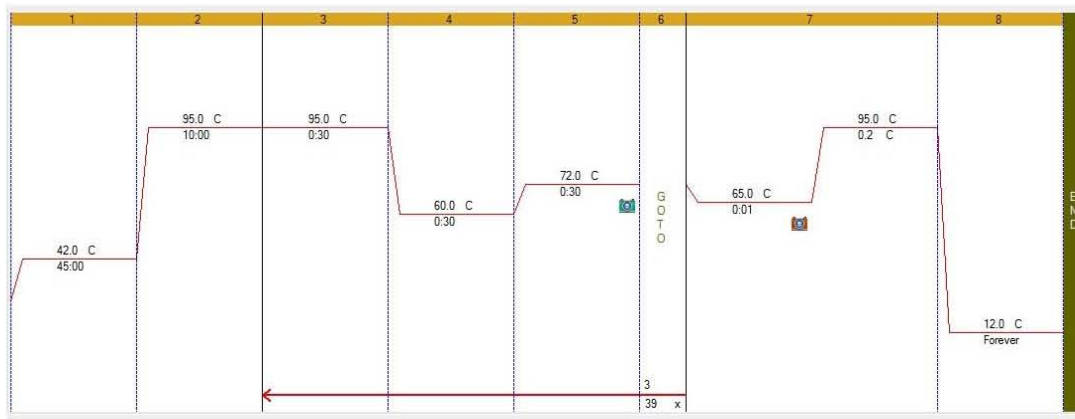


그림 10-26.. KSBV Realtime RT-PCR 조건

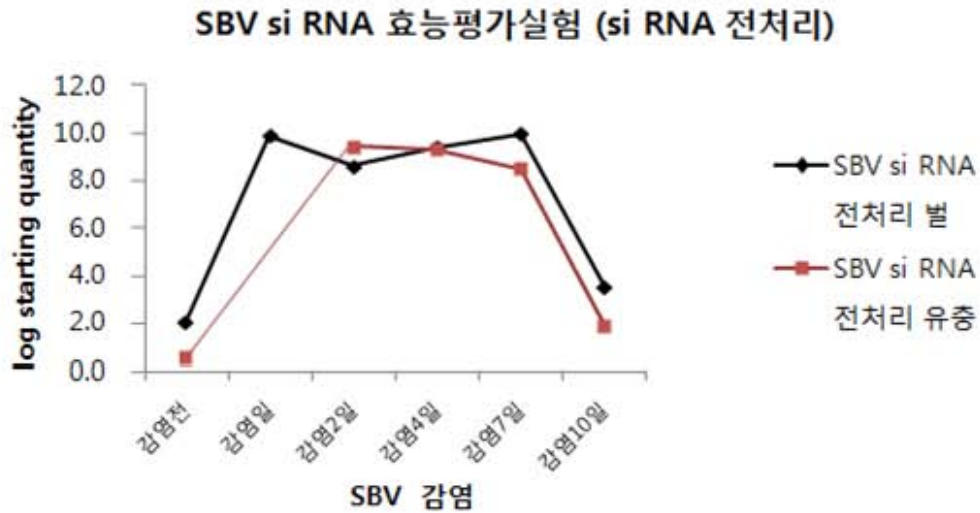


그림 10-27. VP1 si RNA를 전처리한 후 SBV를 인공감염시킨 시료 내 SBV DNA 증폭 그래프

sample	Cq	SQ(log)	SQ
전처리Bee감염전	34.20	2.00	99.3
전처리Bee감염1일	8.06	9.89	7766348512.3
전처리Bee감염2일	12.25	8.62	420981493.7
전처리Bee감염4일	9.63	9.42	2605402282.5
전처리Bee감염7일	7.68	10.01	10123277432.2
전처리Bee감염10일	29.13	3.53	3375.1
전처리유충감염전	39.14	0.51	3.20
전처리유충감염2일	9.43	9.48	2998186981.57
전처리유충감염4일	9.97	9.31	2056573037.78
전처리유충감염7일	12.66	8.50	316831225.07
전처리유충 감염10일	34.60	1.88	75.26

표 10-9. VP1 si RNA를 전처리한 야외 토종벌 SBV 인공감염 시료 내 SBV Real-time PCR 결과

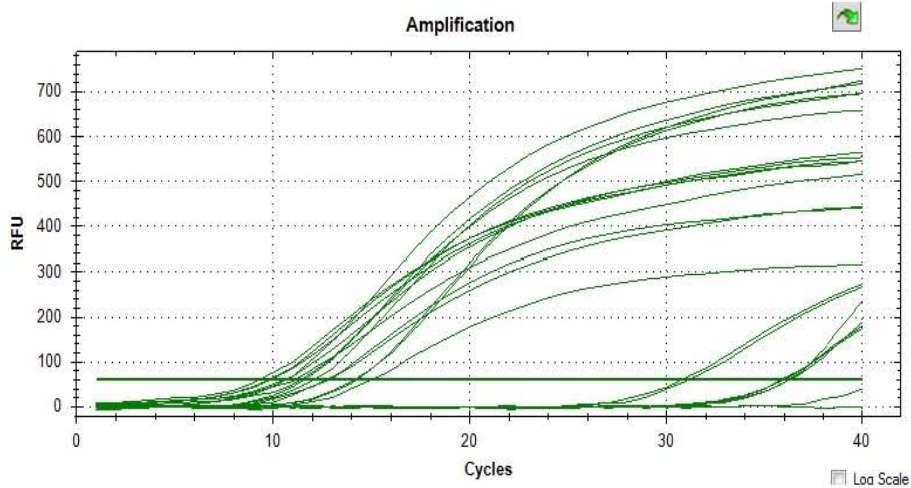


그림 10-28. VP1 si RNA를 전처리한 후 SBV를 인공감염시킨 시료 내 SBV DNA 증폭 그래프

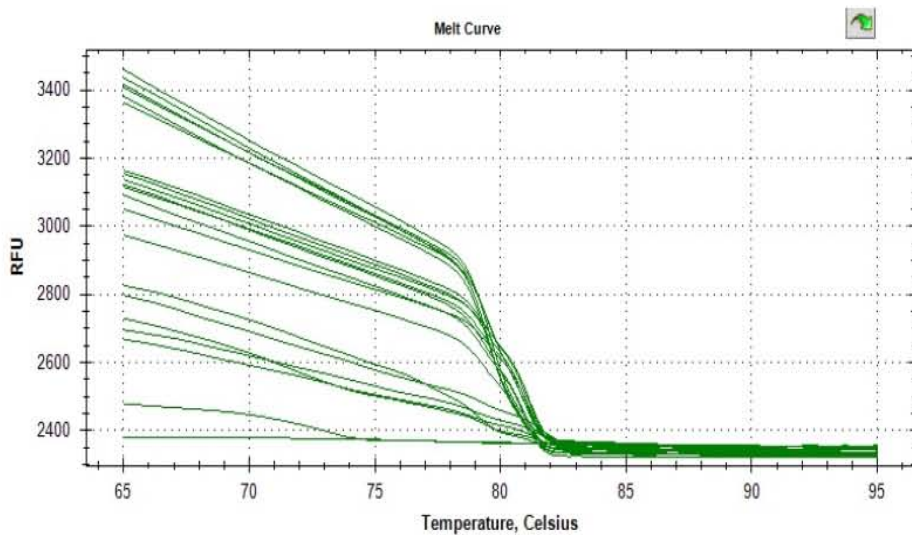


그림 10-29. VP1 si RNA를 전처리한 후 SBV를 인공감염시킨 시료 내 SBV DNA melt curve

제 11 절 *Paenibacillus larvae*와 *Ascosphaera apis*에 특이 항생 /항균제 개발

1. 연구의 목표

본 연구는 문헌상으로 검증된 항생, 항균물질을 임의로 선별하여, 바로 꿀벌의 미국부저병의 원인균인 *Paenibacillus larvae*에 대한 특이항생제와 백목병의 원인균인 *Ascosphaera apis*에 대한 특이 항균제를 발굴하려 기획된 것이다.

가. 벌집으로부터 부저병균 분리 및 동정

부저병 감염이 의심되는 꿀벌집 가검물로부터 미국부저병균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*를 분리하기 위하여 시료를 70°C 30분 가열처리하고 Brain heart infusion agar(BHIA)와 Nutrient agar에 접종하고 37°C 3일간 배양한 결과, 벌집과 꿀벌유충 등을 접종한 가검재료에서 미국부저병균을 분리하였다.

표 11-1. 가검재료로 부터 미국부저병균 분리

가 검 재 료	가검재료 처리	<i>Paenibacillus larvae</i> 분리
꿀벌유충	70°C 30분 가열처리	2주
	무처리	2주
벌집	70°C 30분 가열처리	3주
	무처리	4주
벌집내 꽃가루	70°C 30분 가열처리	0
	무처리	1주



그림 11-1. 부저병 감염이 의심되는 꿀벌집 가검물



그림 11-2. 가검물로부터 세로이 분리한 *Paenibacillus larvae* strain



그림 11-3. 분리한 *Paenibacillus larvae* 현미경 사진



그림 11-4. 분리한 *Paenibacillus larvae* 에 대한 PCR 검사현미경 사진
분리된 균주(5, 8, 14)는 각기 표준균주인 ATCC-27747로 비교, 233bp임을 확인하였다.

2. 항균물질의 *Paenibacillus larvae*에 대한 항균활성

분리한 미국부저병균(*Paenibacillus larvae*)의 각종 항균물질에 대한 감수성을 젤 확산법으로 시험한 결과, 천연 항균물질 1종과 화학제 3종에 대해 농도에 따라 감수성을 보였다.

표 11-2. 분리한 *Paenibacillus larvae*의 시험 물질에 대한 감수성

공시 항균활성 물질	Agar plate에서 억제환 직경
1. 천연 항균물질(0.1%)	0
2. “ (1%)	8mm(재 발육)
3. “ (2%)	11mm
4. 화학제제-3(0.5%)	17mm
5. “ (1%)	23mm
6. “ (1.5%)	26mm
7. 화학제제-2(0.1%)	0
8. “ (1%)	16mm
9. “ (2%)	21mm
10. 화학제(1%)+유기산(5%)	13mm
11. 화학제(1.5%)+유기산(5%)	16mm
12. 화학제(2%)+유기산(5%)	18mm
13. Tris-EDTA(50mM-10mM)	23mm(재 발육)
14. KCl-EDTA(6.5mM-10mM)	29mm(재 발육)

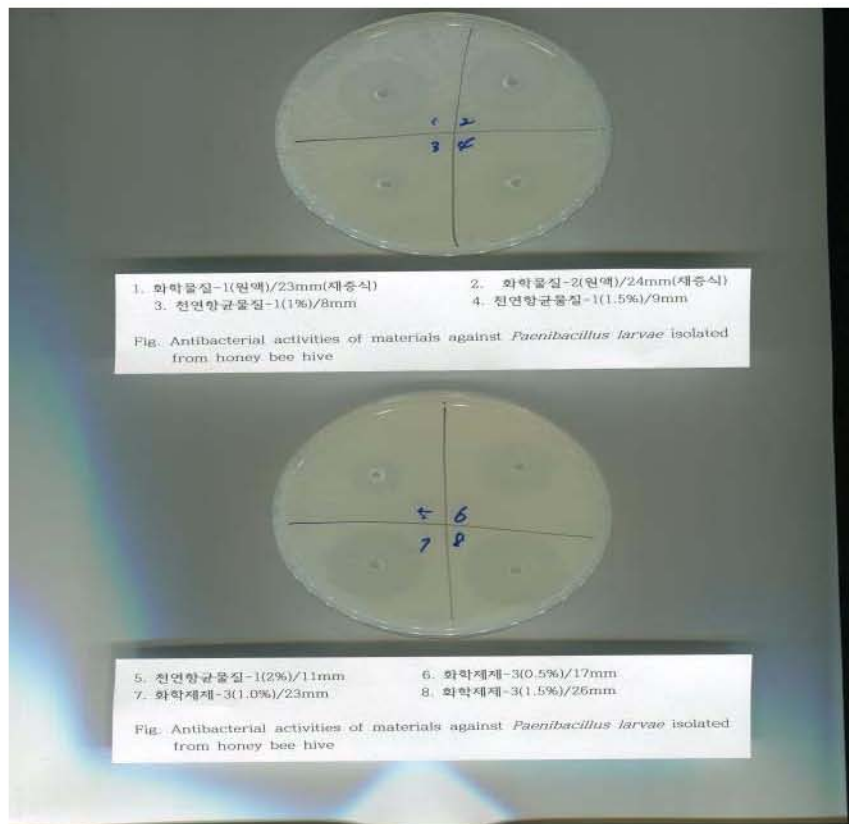


그림 11-5. Agar hole punch법에 의한 항균활성 시험

3. 꿀벌 석고병 원인 곰팡이(*Ascosphaera apis*)에 대한 항진균제 선발

시험물질을 첨가한 곰팡이배지에서의 *Ascosphaera apis* 증식여부로 항진균 활성을 시험한 결과, 9종의 공시한 약용식물 추출물은 석고병 곰팡이에 뚜렷한 항진균활성을 보이지 않았으나, 공시한 6종의 화학물질중 4종이 농도에 따라 항진균 활성을 나타내었다(표 11-3).

표 11-3. 시험물질의 *Ascosphaera apis*에 대한 항진균성

시 험 물 질	항진균 활성
1. 약용식물-1(열탕추출액/2배액)	+
2. 약용식물-2(열탕추출액/2배액)	+++
3. 약용식물-3(열탕추출액/2배액)	+++
4. 약용식물-6(열탕추출액/2배액)	+/-
5. 화학제-1(10배액)	-
6. “ (100배액)	++
7. 화학제-2(1%)+유기산(5%)	-
8. “ (10배액)	-
9. 화학제-5(1%)	-
10. “ (0.1%)	-
11. “ (0.01%)	++
12. 화학제-3(1%)	-
13. “ (0.1%)	-
14. Terbinafine(1mg/ml)	+/-
15. Clotrimazole(1mg/ml)	-
16. Mytomicin(200mcg/ml)	++
17. Griseofulvin(1mg/ml)	+/-



그림 11-6. *Ascosphaera apis* 집락에 대한 항균활성



그림 11-7. 각종 물질의 *Ascosphaera apis*에 대한 항진균능 시험1.

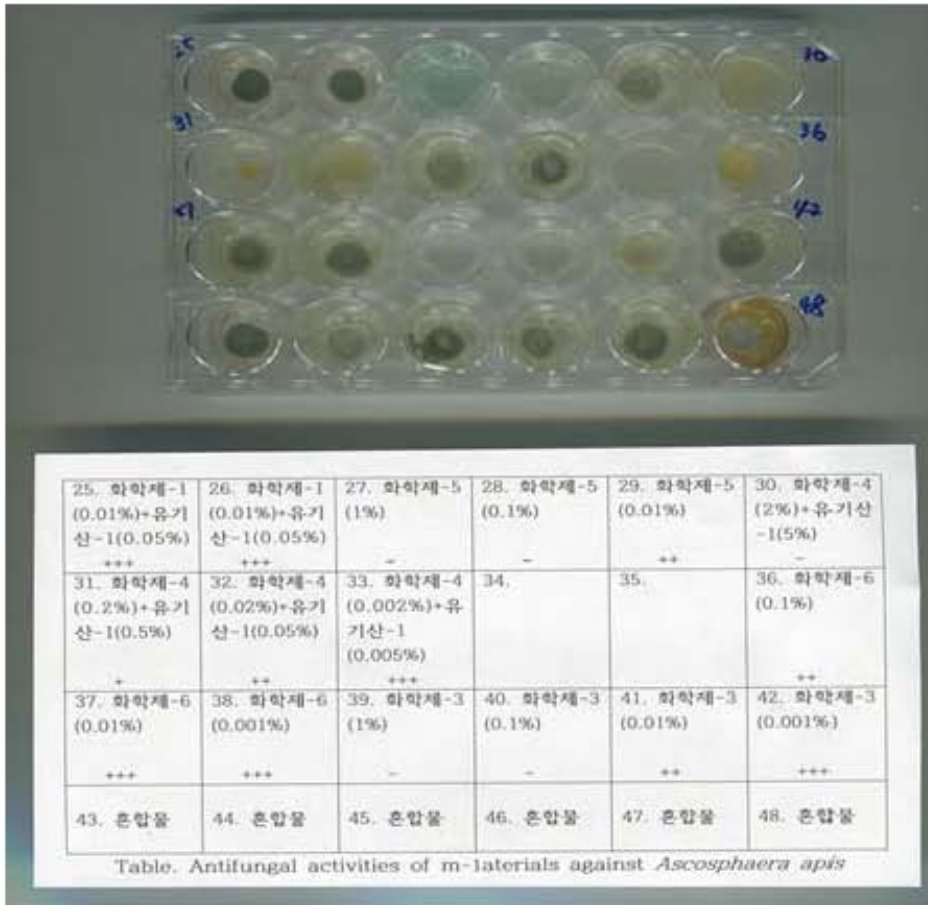


그림 11-8. 각종 물질의 *Ascosphaera apis*에 대한 항진균능 시험2.

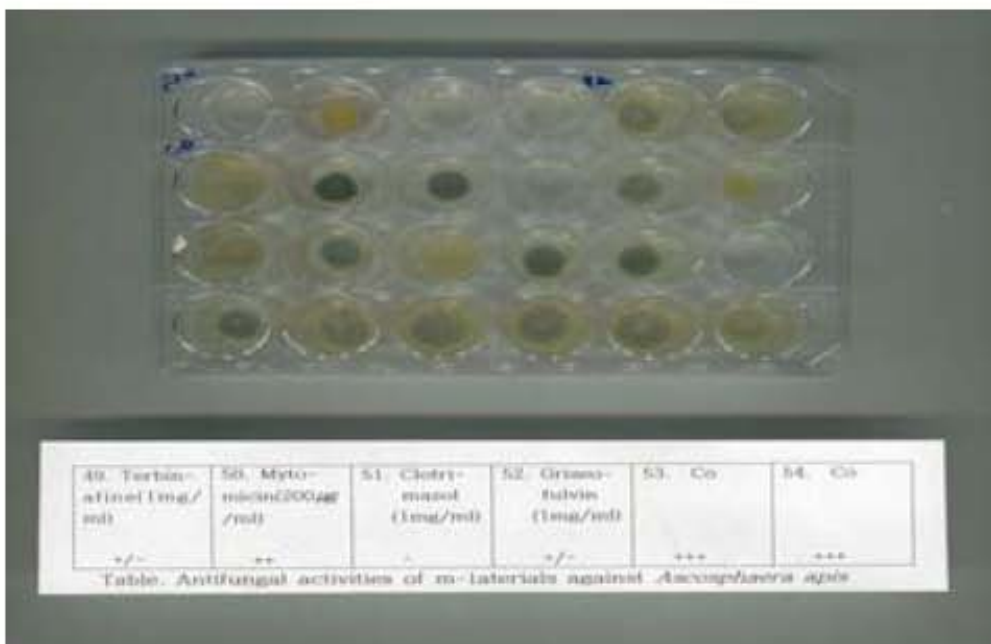


그림 11-9. 각종 물질의 *Ascosphaera apis*에 대한 항진균능 시험3.

4. 선발된 항균 후보물질의 실험실적 효능 평가

선발된 항균후보물질들의 효능을 비교평가하기 위해 페니실린과 각 후보물질의 미국부지병원균 (*Paenibacillus larvae*)에 대한 최소억제농도 (MIC)를 측정하였다. 각 항균후보물질 농도가 100ug/ml인 Muller Hilton broth를 2진법으로 128배까지 희석하여, 각 희석액 10ml당 균액 (OD=1.0, 600nm) 0.5ml을 접종 한 후, 37도씨에서 하루 동안 배양하여 균의 성장을 관찰하였다. 시험 결과, 페니실린, 천연-균-1, 화학-균-1, 화학-균-2와 화학-균-3은 각각 32배, 32배, 16배, 64배와 8배 희석액까지 균의 성장이 억제되었다. 각 후보물질과 페니실린의 MIC를 비교했을 때, 화학-균-1과 화학-균-3은 페니실린보다 효능이 떨어졌으며, 천연-균-1은 비슷한 수준의 효능을 보였다. 화학-균-2는 페니실린보다 뛰어난 효능을 보여 항균후보물질 중 효능면에서 가장 적합하다고 판단되었다.

표 11-4. 항균후보 물질의 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Test

항균후보물질	원액 (100ug/ ml)	2배 희석	4배 희석	8배 희석	16배 희석	32배 희석	64배 희석	128배 희석
페니실린	-	-	-	-	-	-	+	+
천연-균-1	-	-	-	-	-	-	+	+
화학-균-1	-	-	-	-	-	+	+	+
화학-균-2	-	-	-	-	-	-	-	+
화학-균-3	-	-	-	-	+	+	+	+

- ; no sign of bacterial growth, + ; visible signs of bacterial growth

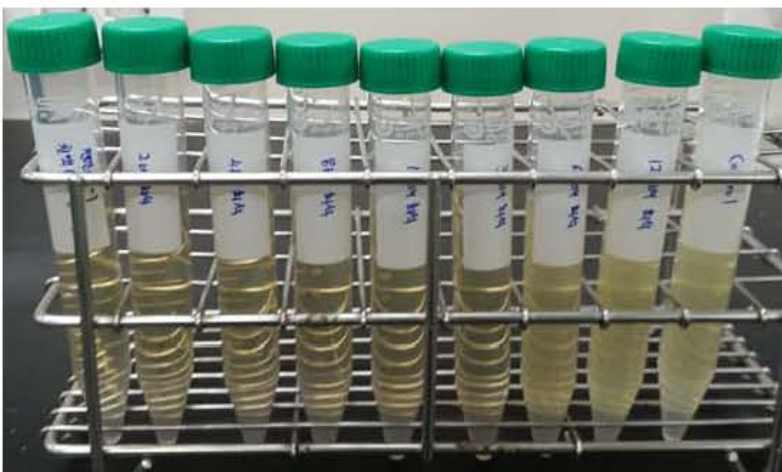


그림 11-10. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Test

제 12 절 kSBV의 서양종 꿀벌 인공 감염에서 바이러스의 복제 능력 및 양성 분석

1. 서론.

본 연구는 kSBV (korean Sacbrood Virus)를 인공배양의 조건에서 서양종 꿀벌의 유충에 감염시켜, 바이러스의 복제양상을 정량적으로 분석한 것이다. 본 연구에서 왜 kSBV가 동양종 꿀벌에 대하여 치명적이나, 서양종 꿀벌은 저항성을 갖는지 설명할 수 있었으며, 꿀벌바이러스의 복제모델에 대하여 여러 증거를 제시할 수 있었다. 본 연구는 Journal of Agricultural Science and Technology에 “Infection of Korean Sacbrood virus to *Apis mellifera* : Analysis on its capability of viral replication”의 제목으로 투고되었기에, 본 보고서에는 그 결과를 중심으로 간략히 기술한다.

2. 요약 결과

초고속 원심분리기로 분리한 kSBV는 인공배양된 2일령의 꿀벌의 유충에 인공배지 섭취를 통하여 감염시켰다. 감염된 유충들은 positive strand(바이러스의 유전체형)와 negative strand (복제형)를 구분하는 정량 PCR로 세밀하게 그 증가/감소 양상을 분석하였다.

Table 12-1. The specific primer for diagnosis kSBV

Name	Sequence (5'→3')	Reference
SBV Type Fwd.	TCT AAA ATG AGA GTG AAA GT	Lee et al., 2014
SBV Type Ill	GCG GGC AGG AAT CTA TGT GGA	

감염된 유충들의 positive strand(바이러스의 유전체형)와 negative strand (복제형)들의 수는 또한 kSBV의 RNA 유전체 중 각 유전자 부위, 즉 구조단백질 VP1부위, RNA중합효소인 RdRP부위, 그리고 특이 펩티드 절단효소인 C3G Peptidase부위를 세분하여 정량하였으며, 각 유전자 부위가 동등하게 전사되는지를 확인하고자 하였다.

Table 12-2. The specific primers for diagnosis kSBV-cistrons

Name	Sequence (5'→3')	Reference
kSBV VP1-F	GCT GGA TCC TGG ATG CCT ATA AAT TCA ATT	T h i s study.
kSBV VP1-R	GCT GTC GAC AAC TTT GTA CGA CAT TCC CGC	
kSBV RdRp-F	CAC GGA TTC AAG CGA AAA TCC GAG TTG	
kSBV RdRp-R	CCG GTC GAC TAT CCA TTG AGT GGT ATC AT	
kSBV-peptidase-F	GAT AGA TCT CCA GCG CGT GTT GAG TTT GTT	
kSBV-peptidase-R	GTA GTC GAC TAC TGG GTC CTT CCC AAT CTT	
B-actin-F	ATG CCA ACA CTG TCC TTT CTG G	
B-actin-R	GAC CCA CCA ATC CAT ACG GA	

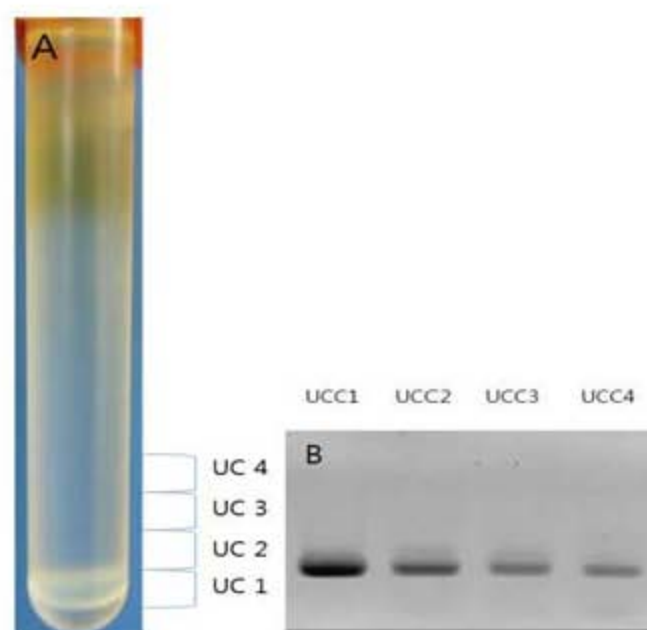


Figure 12-1. Isolated for Korean Sacbrood virus to *Apis cerana* larvae

Panel A: ultracentrifuge of kSBV sample, Panel B: electrophoresis of purified kSBV fraction
PCR product,

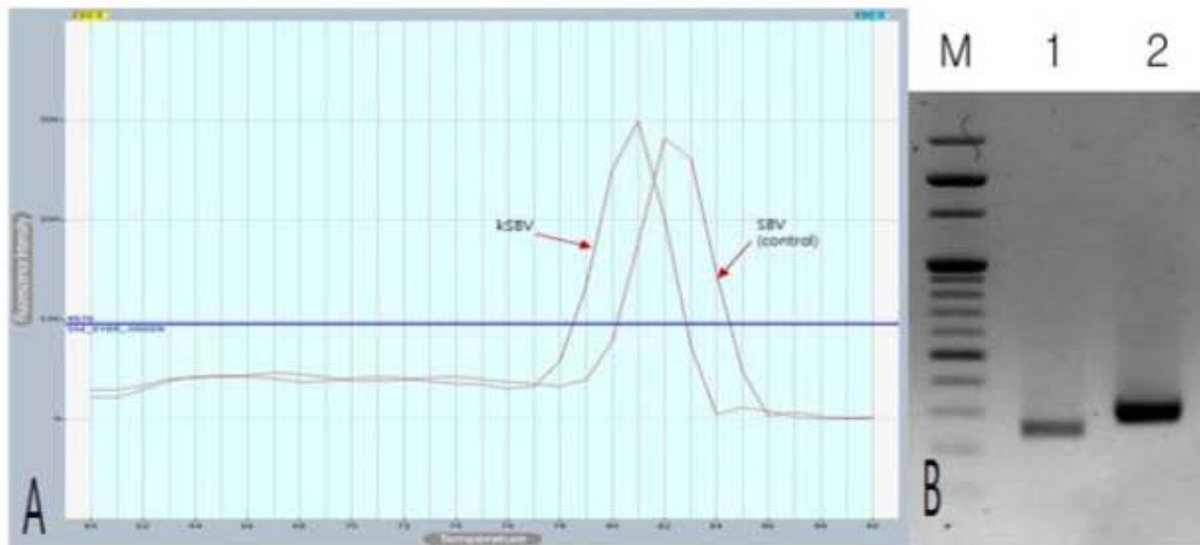


Figure 12-2. The alignment result of SBV complete genome sequence and characterized into 3 genotypes. Detection of the kSBV based on Melting analysis. Panel A: melting analysis of kSBV genotype & SBV genotype, Panel B: electrophoresis of kSBV genotype & SBV genotype PCR product.

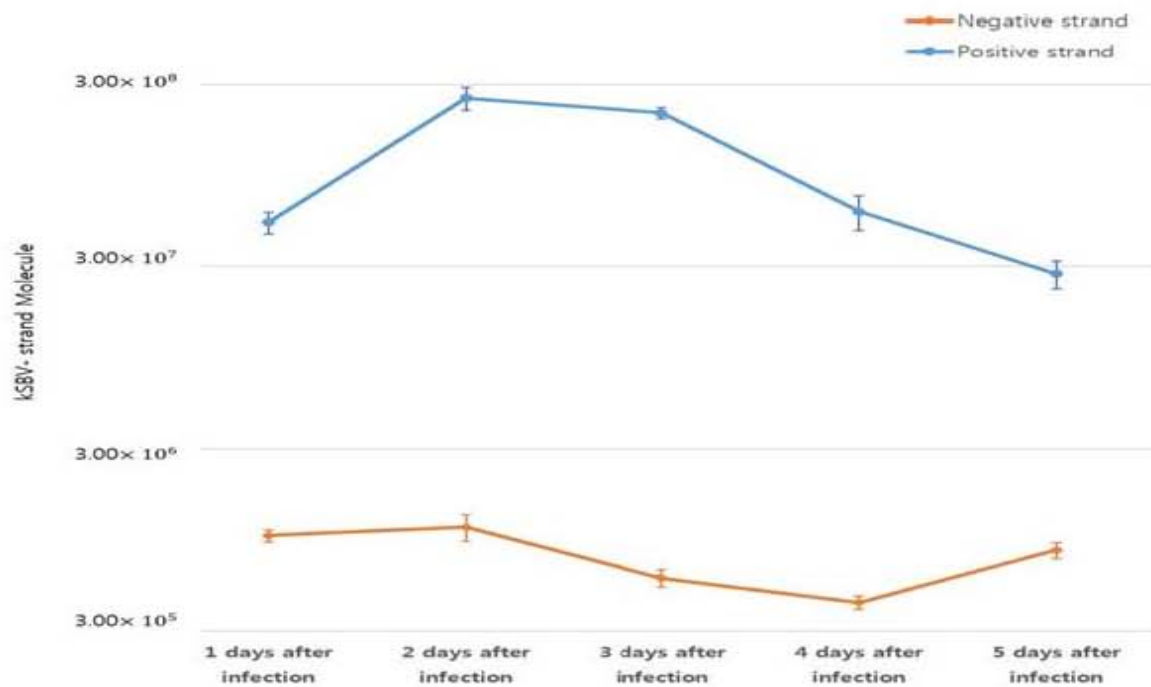


Figure 12-3. Analysis for kSBV strand for period days after artificial infection
 Analysis for change to the kSBV Positive & Negative strand copies. In the result, after infected 2 days show high copy of positive & negative strain range but after this day the positive & negative strain is decreased. This result mean, the infected 2 days has high copy number of kSBV virus and efficient replication work. Bars represent mean values (\pm SD) of 3~6 independent infection sample.

Positive strand(바이러스의 유전체형)와 negative strand (복제형)들의 감염된 꿀벌 유충에서 수의 증감은 일령별로 분명히 다르게 나타났으며, negative strand (복제형)의 수는 Positive strand(바이러스의 유전체형)의 수에 비하여 일반적으로는 1/100의 수준이었으나, 감염초기 2일령에는 Positive strand(바이러스의 유전체형)의 수가 급격히 증가하였고, 이후 5일령에서는 빠르게 감소하였다(Fig. 12-3).

이는 각 strand의 정량치를 대변하는 Ct값의 분석에서 분명히 드러나며, Negative strand의 증가가 positive strand의 증폭을 선도하고 있다.

Table 12-3. Analysis for kSBV strand amplification rate of period days after artificial infection based in *Apis mellifera* larvae

		1 days past infection	2 days past infection	3 days past infection	4 days past infection	5 days past infection
positive strand	molecule number of 1 larvae	5.23×10^7	2.54×10^8	2.10×10^8	6.00×10^7	2.37×10^7
	Relative ratio	1.62	7.87	6.53	1.86	0.85
negative strand	molecule number of 1 larvae	1.00×10^6	1.11×10^6	5.84×10^5	4.29×10^5	8.32×10^5
	Relative ratio	2.94	3.28	1.72	1.26	2.45

Positive strand(바이러스의 유전체형)와 negative strand (복제형)들의 정량적 비는 정확히 감염후 3일차에 극명한 피크를 이루며 그 비는 약 350배에 달하고 있다 (그림 12-4).

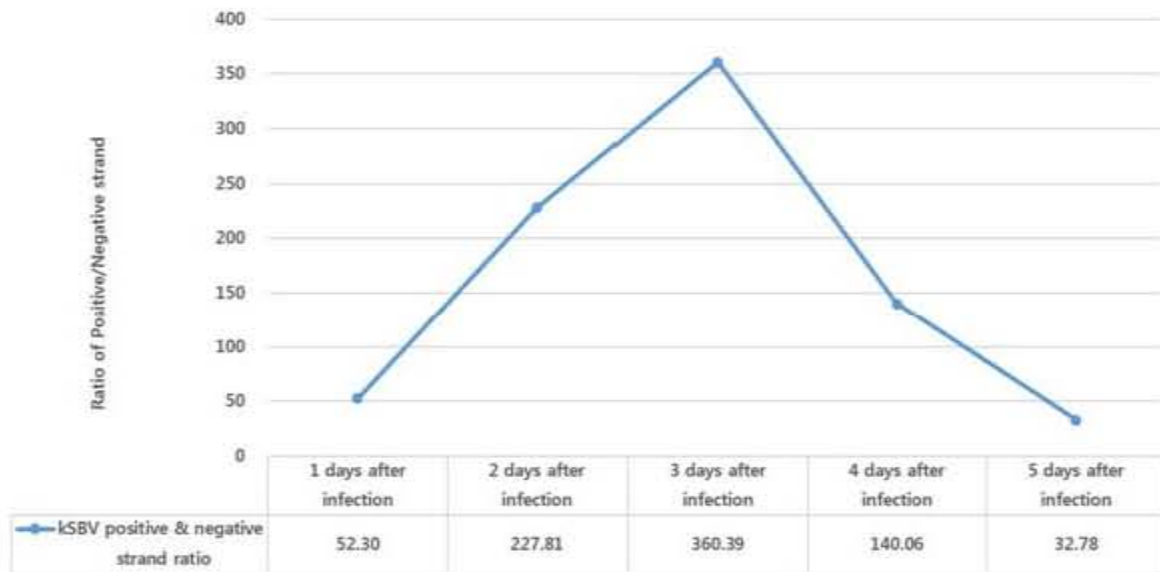


Figure 12-4. Analysis for kSBV Positive & Negative strand ratio during period days.

Analysis for change to the kSBV Positive & Negative strand ratio. In the result, the positive and negative strand ratio was increase to 4days. 4 days show a highest strand ratio. Because positive strand was decreased slowly but negative strand was decreased dramatically. This result means, during the period days, negative strand make many positive strand.

감염된 꿀벌 유충에서 Positive strand(바이러스의 유전체형)와 negative strand (복제형)의 수의 증감은 각기 다른 양상을 보이고 있으며, Positive strand(바이러스의 유전체형)는 완만히 감소하나, negative strand는 보다 빠르게 감소하는 경향을 보이고 있다. 이는 negative strand의 생성이 억제되는 양 보이며, 정확한 기작은 추론 수준이나, 서양종 꿀벌이 kSBV에 대한 저항성보이는 것도 이 원인이 아닌가 추론된다(Fig. 12-5; Table 12-4).

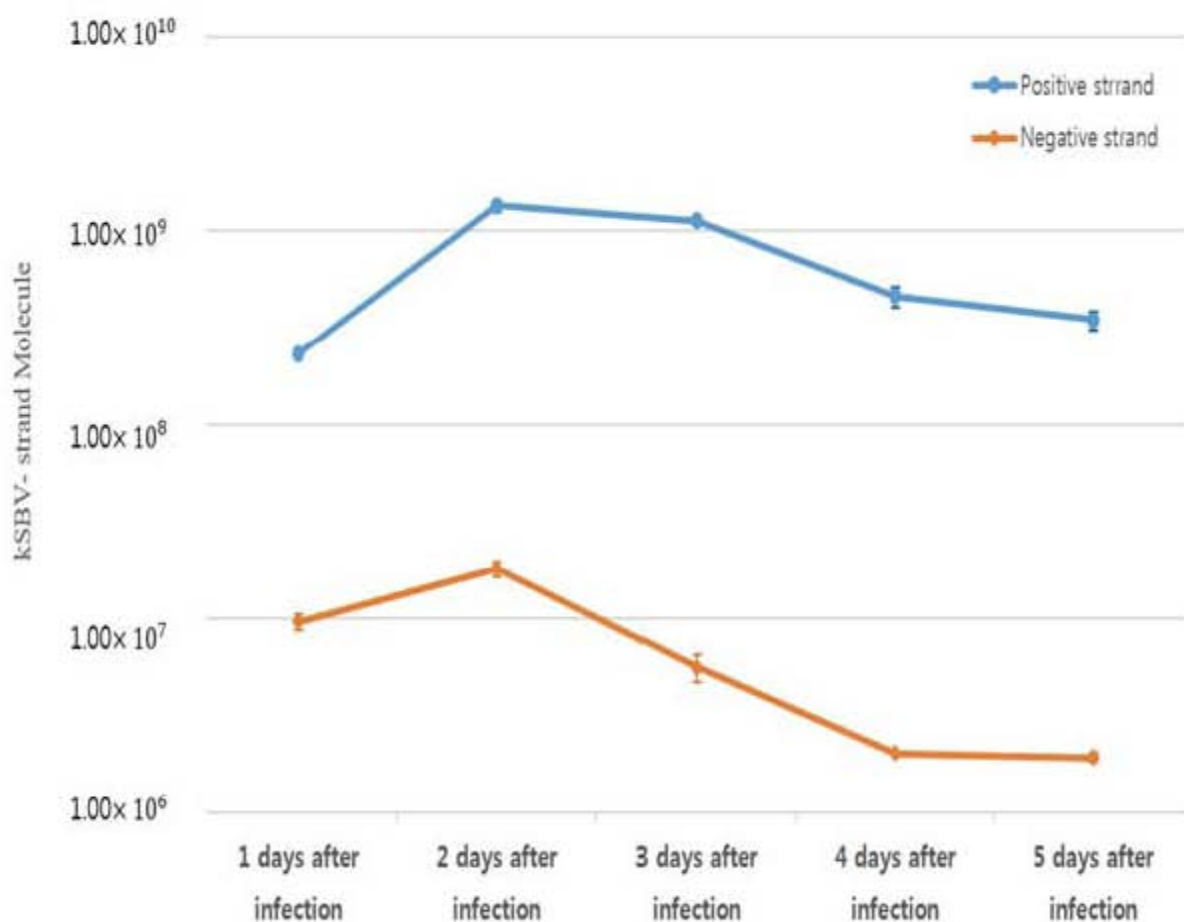


Figure 12-5. Analysis for kSBV strand for period days after artificial infection

Analysis for change to the kSBV Positive & Negative strand copies. In the result, after infected 2 days show high copy of positive & negative strain range but after this day the positive & negative strain is decreased. This result mean, the infected 2 days has high copy number of kSBV virus and efficient replication work. Bars represent mean values (\pm SD) of 3~6 independent infection sample.

Table 12-4. Analysis for kSBV strand amplification rate of period days after artificial infection based in *Apis mellifera* larvae

		1 days past infection	2 days past infection	3 days past infection	4 days past infection	5 days past infection
positive strand	molecule number of 1 larvae	2.30×10^8	1.33×10^9	1.12×10^9	4.59×10^8	3.46×10^8
	Relative ratio	14	83	70	29	22
negative strand	molecule number of 1 larvae	9.59×10^6	1.81×10^7	5.62×10^6	2.03×10^6	1.93×10^6
	Relative ratio	2257	4251	1323	455	0

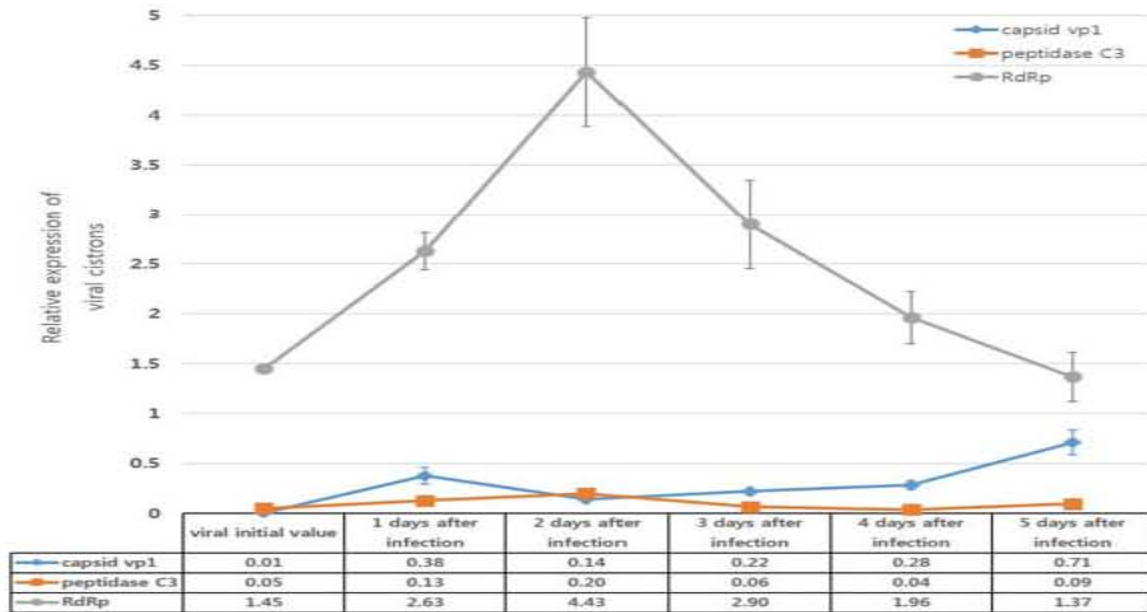


Figure 12-6. RT-qPCRs assay of viral cistrons expression.

RT-qPCRs assay of viral cistrons expressing the outer capsid protein VP1 and nonstructural proteins protease and RdRp during infection of *Apis mellifera* larvae of by kSBV. The results were normalized against the level of the honeybee b-actin gene. Error bars indicate standard errors from three independent sample.

한편, Positive strand (kSBV의 RNA 유전체) 중 각 유전자 부위, 즉 구조단백질 VP1부위, RNA중합효소인 RdRP부위, 그리고 특히 펩티드 절단효소인 C3G Peptidase부위에 대한 개별 정량치는 각 유전자 부위가 매우 다른 비율로 전사되는 것으로 측정되었으며, 이는 Positive strand가 꿀벌의 세포내에서 일반적 mRNA와 같이 단백질 합성을 하고, 이들은 여러 유전자 부위가 함께, cistron처럼 전사된다는 통설을 설명하기 어렵게 한다. 감염 2일차에 VP1부위의 RNA는 크게 증가하며, 이후 감소하나, 다른 유전자 부위 (RdRP, Peptidase)의 RNA는 증가세를 발견할 수 없었다 (Fig. 12-6).

Table 12-5. Analysis for kSBV strand for infection molecules based on *Apis mellifera* larvae.

Infected kSBV molecule	Negative strand	Positive strand
10^7 copies of kSBV	1.12×10^9	1.12×10^9
10^6 copies of kSBV	5.63×10^5	4.71×10^6
10^5 copies of kSBV	1.70×10^6	2.08×10^6
10^4 copies of kSBV	3.04×10^5	6.16×10^5
10^3 copies of kSBV	0.00×10^0	1.33×10^5
10^2 copies of kSBV	0.00×10^0	2.98×10^4
10^1 copies of kSBV	0.00×10^0	0.00×10^0
10^0 copies of kSBV	0.00×10^0	0.00×10^0
Negative Control	0.00×10^0	0.00×10^0

제 13 절 조직 내 교잡법과 병리조직학적 검사를 통한 꿀벌 질병의 예방 및 치료 물질의 효능 분석

1. 낭충봉아 부패병에 대한 조직 내 교잡법 개발

가. 낭충봉아 부패병 바이러스 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작

이미 제공받은 낭충봉아 부패병 감염 애벌레 및 성충에서 insect virus specific RNA extraction kit를 이용하여 viral RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 reverse transcription PCR을 통해 cDNA로 준비하였다. Reverse transcription PCR 조성은 DEPC DW 3.5 μ l, X10 buffer 2 μ l, dNTP mixture 2 μ l, RNA inhibitor 0.5 μ l, MULV reverse transcriptase 0.5 μ l, random hexamer 0.5 μ l, RNA 2 μ l로 되어있으며 중합효소 연쇄반응의 조건은 45 $^{\circ}$ C에서 40분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 10분을 수행한다. 그리고 미리 제작한 낭충봉아 부패병에 특이적인 PCR primer를 제작하여 중합효소 연쇄반응의 기법을 수행하였다. 전방향 프라이머 (SBV-F): AAC AAC CGA TTC CTC AGT AG, 후방향 프라이머 (SBV-R): TCT TCG TCC ACT CTC ATC AC 이용하여, 94 $^{\circ}$ C 5분간 denaturation 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 조건으로 35회 반복하고 72 $^{\circ}$ C 10분간 elongation하는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 258bp의 DNA product를 얻었다.

나. 낭충봉아 부패병 바이러스 특이 탐색자(probe) 제작

중합효소 연쇄반응을 통해 얻은 증폭된 DNA를 DNA purification kit(Quagen)를 이용하여 정제하였다. 정제한 DNA를 30 μ l를 100 $^{\circ}$ C에 10분간 끓여 완전히 denature시킨다. 이후 급속히 얼음에 3분간 식혀 상태를 유지한다. 그 후 denatured DNA 15 μ l, hexanucleotide mix 2 μ l, dNTP mixture 2 μ l, Kleulow enzyme 1 μ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 2일간 incubation 시킨다. 2일이 경과된 후에 0.2M EDTA를 2 μ l를 넣어 반응을 정지시킨다. 반응을 정지 시킨 후에 4M LiCl 2.5 μ l와 prechilled 100% EtOH 75 μ l를 넣고 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 정제 시킨 후에 14000rpm 15분간 원심 분리한다. 원심분리 후에 완전히 건조시킨 후 TE buffer를 이용해 희석시킨다. 그 뒤 DIG-labelling kit를 이용하여 digoxigenin을 임의 표지하여 probe를 제작하였다. 그 과정은 다음과 같다. 위 과정을 통해 얻은 산물을 검출(detection)하는 과정을 통해 농도를 결정하고 탐침자(probe)로 사용하였다.

다. 애벌레 및 꿀벌 성충 조직을 탐색을 위한 파라핀 고정 방법 개발

중합효소 연쇄반응을 통하여 낭충봉아 부패병 바이러스에 감염된 것으로 확인된 애벌레 및 성충 개체를 파라핀 블록으로 제작하기 위해 고정하였다. 곤충 조직 외부에 존재하는 큐틴질

외피가 포르말린 고정에 극히 방해를 입히므로 본 실험실에서는 다른 방법을 고안하였다. 10% 중성포르말린을 고정액으로 사용하였으며 주사기를 이용하여 개별 개체 내부에 직접 포르말린을 주입하였다. 1일부터 10일간 순차적으로 고정된 조직을 파라핀 포매과정하여 가장 최적화된 고정 기간을 산출하였다.

라. 정상 에벌레 조직 및 꿀벌 성충 H&E 염색법 개발, 판독

질병에 감염되지 않은 정상 에벌레와 꿀벌 성충 조직을 고정 후 파라핀 블록으로 제작한 뒤 직접 H&E 염색을 통해 슬라이드 상에서 장기 및 세포를 관찰하였다. 이를 통해 낭충봉아 부패병, 부저병, 석고병에 감염된 개체의 병리 조직학적 상태를 비교할 수 있었다.

마. 조직내 교잡법을 이용한 에벌레에서 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산 검출

제작한 낭충봉아 부패병 바이러스의 특이적인 탐색자를 이용하여 낭충봉아 부패병 바이러스 감염을 진단하기 위한 조직내 교잡법(in situ hybridization)을 실시하였다. Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2 N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100 µg/ml Proteinase K를 37°C에서 30분간 처치한다. 그 후 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 낭충봉아 부패병 바이러스의 특이적인 탐색자(probe)를 1 µg/µl의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직당 20-30 µl씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94°C 10분간 처치후, 45°C incubator에 15시간 배양한다. Cover slip을 제거한 후에 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. 그 후 maleic acid buffer에 5분간 처리하고 다시 blockig buffer로 10분간 처리한다. Blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36°C에서 1-2시간 incubation한다. 그 후 다시 maleic acid buffer 10분간 처리하고, 곧장 blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP 및 Fast RED를 이용하여 낭충봉아 부패병 바이러스의 핵산(DNA)을 검출한다.

조직내 교잡법을 실시하여 꿀벌 에벌레 내에서 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산을 검출한 사례는 본 연구실이 최초이며 이를 통해 본 연구실은 실제 낭충봉아 부패병이 에벌레 조직 내에서 기생하는 부위를 밝혀내었다. 또 이를 통해 증식 기전 및 병리학적인 병인론을 확인할 중요한 단서를 마련하였다.

바. 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산의 에벌레 조직내 교잡법 결과 분석 방법

조직내 교잡법의 실시가 종료된 에벌레 조직은 현미경상에서 임의로 0.25mm²의 면적을 3곳 정하여 낭충봉아 부패병 바이러스에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 에벌레 조직 내 주로 분포하는 세포와 기관을 찾아내었다.

2. 낭충봉아 부패병의 자연 감염 모델 확립

가. 낭충봉아 부패병 바이러스 자연감염 농장 확보 및 진단 샘플 확보

경기도 이천 지역에서 2014년에 발병한 농장을 중심으로 바이러스 분리 및 감염 개체 확보를 실시하였다. 감염된 봉군에서는 다수의 애벌레가 낭에 액이 차있는 상태로 관찰되었으며 또 갈색으로 착색되어 건조한 다수의 죽은 애벌레가 관찰되었다. 여왕벌은 봉군을 포기하고 떠난 상태였다.

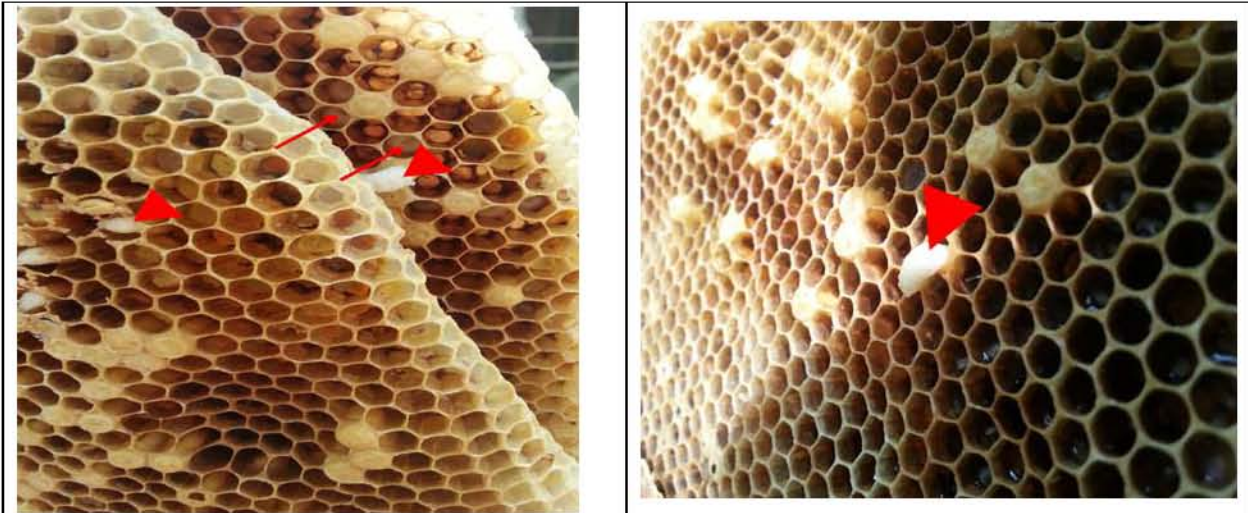


그림 13-1.

감염되어 죽은 애벌레 : 붉은 화살표

표면에 물질이 보이는 애벌레 : 붉은 삼각형

체표면에 물질이 관찰된 애벌레 확대 : 붉은

삼각형

다수의 애벌레에서 insect virus specific RNA extraction kit를 이용하여 viral RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 reverse transcription PCR을 통해 cDNA로 준비하였다. Reverse transcription PCR 조성은 DEPC DW 3.5 μ l, X10 buffer 2 μ l, dNTP mixture 2 μ l, RNA inhibitor 0.5 μ l, MULV reverse transcriptase 0.5 μ l, random hexamer 0.5 μ l, RNA 2 μ l로 되어있으며 중합효소 연쇄반응의 조건은 45 $^{\circ}$ C에서 40분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분, 4 $^{\circ}$ C에서 10분을 수행한다. 그리고 미리 제작한 낭충봉아 부패병에 특이적인 PCR primer를 제작하여 중합효소 연쇄반응의 기법을 수행하였다. 전방향 프라이머 (SBV-F): AAC AAC CGA TTC CTC AGT AG, 후방향 프라이머 (SBV-R): TCT TCG TCC ACT CTC ATC AC 이용하여, 94 $^{\circ}$ C 5분간 denaturation 후 94 $^{\circ}$ C 30초, 58 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초 조건으로 35회 반복하고 72 $^{\circ}$ C 10분간 elongation하는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 258bp의 DNA product를 확인할 수 있었다. 농장의 원인체가 낭충봉아 부패병 바이러스임을 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다.

나. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 진단 샘플 확보

감염된 봉군의 애벌레 다수를 크기에 따른 연령 분류 작업을 실시하였다. 애벌레는 감염시기가 명확하게 밝혀진 바가 없으나 현 과제에서 애벌레 크기에 따라 연령을 가늠한 뒤 조직 내

교잡법을 통해 감염여부를 밝혀 정확한 감염시기를 확인할 수 있었다.
크기에 따른 연령 유추 기준은 다음과 같다.

- 1) 3mm 이하 : 부화 후 3일령 이하
- 2) 3~6mm : 부화 후 3~7일령
- 3) 6~10mm : 부화 후 7일 이상 번데기 단계



그림 13-2.
감염 애벌레 크기별 분류 및 연령 조사

감염된 애벌레는 작년도 개발한 낭충봉아 부패병에 특이적인 탐침자를 이용한 조직 내 교잡법을 이용하여 조직 내 항원을 검출하였다. 조직 내 양성 항원을 보인 애벌레는 바이러스에 감염된 것으로 확증하였다. 조직 내 교잡법 방법은 다음 과정으로 수행하였다.

Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 합수과정을 실시한다. 0.2 N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100 µg/ml Proteinase K를 37°C에서 30분간 처치한다. 그 후 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 낭충봉아 부패병 바이러스의 특이적인 탐색자(probe)를 1 µg/µl의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직당 20-30 µl씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization machine상에서 94°C 10분간 처치후, 45°C incubator에 15시간 배양한다. Cover slip을 제거한 후에 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. 그 후 maleic acid buffer에 5분간 처리하고 다시 blockig buffer로 10분간 처리한다. Blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36°C에서 1-2시간 incubation한다. 그 후 다시 maleic acid buffer 10분간 처리하고, 곧장 blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP 및 Fast RED를 이용하여 낭충봉아 부패병 바이러스의 핵산(DNA)을 검출한다.

통계적 처리를 위해 각 연령 별 감염 확인된 개체수를 조직 내 교잡법을 시행한 전체 개체수로 나누어 각 연령별 감염 %를 계산하였다.

다. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 조직 내 병변 확인

감염된 애벌레의 조직을 H&E Staining을 통해 병변을 확인하였다. 발생 중인 애벌레의 각 기관과 세포의 병변 유무를 현미경 상에서(X40~200)에서 확인하였다.

라. 낭충봉아 부패병 바이러스 감염 애벌레 시기별 조직 내 바이러스 분포

감염된 개체의 조직에서 낭충봉아 부패병 바이러스의 항원이 검출된 기관과 세포를 정리하였다.

3. 부저병에 대한 조직 내 교잡법 개발

가. 부저병 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작

부저병 감염 애벌레 및 성충에서 insect 세균 specific DNA extraction kit를 이용하여 세균 DNA를 추출하였다. 그리고 미리 제작한 부저병에 특이적인 프라이머를 제작하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. 다음과 같은 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 전방향 미국형 부저병 프라이머 (GTG TTT CCT TCG GGA GAC G), 후방향 미국형 부저병 프라이머 (CTC TAG GTC GGC TAC GCA TC), 전방향 유럽형 부저병 프라이머 (AAG AGT AAC TGT TTT CCT CG), 후방향 유럽형 부저병 프라이머 (ACG CCT TAG AGA TAA GGT TT)를 이용하여, 94°C 5분간 denaturation 후 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초 조건으로 35회 반복하고 72°C 10분간 elongation하는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 231bp(미국형), 564bp(유럽형)의 DNA product를 얻었다.

나. 부저병 세균 특이 탐색자(probe) 제작

중합효소 연쇄반응을 통해 얻은 증폭된 DNA를 DNA purification kit를 이용하여 정제하였다. 정제한 DNA를 30 µl를 100°C에 10분간 끓여 완전히 denature시킨다. 이후 급속히 얼음에 3분간 식혀 상태를 유지한다. 그후 denatured DNA 15 µl, hexanucleotide mix 2 µl, dNTP mixture 2 µl, Kleulow enzyme 1 µl를 혼합하여 37°C에서 2일간 incubation 시킨다. 2일이 경과된 후에 0.2M EDTA를 2 µl를 넣어 반응을 정지시킨다. 반응을 정지 시킨 후에 4M LiCl 2.5 µl와 prechilled 100% EtOH 75 µl를 넣고 -70°C에서 30분간 정제 시킨 후에 14,000 rpm 15분간 원심 분리한다. 원심분리후에 완전히 건조시킨 후 TE buffer를 이용해 희석시킨다. 그 뒤 DIG-labelling kit를 이용하여 digoxigenin을 임의 표지하여 probe를 제작하였다. 그 과정은 다음과 같다. 위 과정을 통해 얻은 산물을 검출(detection)하는 과정을 통해 농도를 결정하고 탐침자(probe)로 사용하였다.

다. 조직내 교잡법을 이용한 애벌레에서 부저병 세균 핵산 검출

제작한 부저병 세균의 특이적인 탐색자를 이용하여 부저병 세균 감염을 진단하기 위한 조직내 교잡법을 실시하였다. Xylene에 탈파라핀 과정 후, 단계적인 함수과정을 실시한다. 0.2 N HCl에 20분간 처치한다. DW에 30초간 세척 후 100 µg/ml Proteinase K를 37°C에서 30분간 처치한다. 그후 4% paraformaldehyde에 10분간 처리한다. PBS 세척 후, Triethanolamine-HCl buffer에 acetic anhydride를 넣어 10분간 acetylation시킨다. 2× SSC에 10분간 처치한다. 조직상에 부저병 세균의 특이적인 탐색자(probe)를 1 µg/µl의 농도로 hybridization buffer에 희석하여 조직당 20-30 µl씩 적용하고, cover slip을 덮고 sealing한다. 각각의 조직을 hybridization

machine상에서 94°C 10분간 처치후, 45°C incubator에 15시간 배양한다. Cover slip을 제거한 후에 4×SSC, 2×SSC, 0.2×SSC에 각 10분씩 세척단계를 실시한다. 그 후 maleic acid buffer에 5분간 처리하고 다시 blockig buffer로 10분간 처리한다. Blocking buffer에 1:250-500으로 희석된 anti-DIG AP conjugate를 적용하여 36°C에서 1-2시간 incubation한다. 그 후 다시 maleic acid buffer 10분간 처리하고, 곧장 blocking buffer에 5분간 처리한다. NBT/BCIP 및 Fast RED를 이용하여 부저병 세균의 핵산(DNA)을 검출한다.

4. 석고병에 대한 특이적인 염색법 개발

가. 석고병 감염 개체에 대한 H&E 염색 및 관독

석고병에 감염된 것으로 의심되는 애벌레와 꿀벌 성충 조직을 중합효소 연쇄반응을 통해 석고병 진단 가능한 특이적인 프라이머를 통해 감염을 확인하였다. 석고병 감염 의심 애벌레 및 성충에서 insect virus specific DNA extraction kit를 이용하여 곰팡이 DNA를 추출하였다. 그리고 미리 제작한 석고병에 특이적인 프라이머를 제작하여 중합효소 연쇄반응 기법을 수행하였다.

곰팡이의 18s단백질 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하여, 전방향 프라이머 (*A. flavus*-F): ATCGGGCGGTGTTTCTATG와 후방향 프라이머 (*A. flavus*-R): ACCGGGCTATTAAAGGGCCG 이용하여, 94°C 5분간 denaturation 후 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초 조건으로 35회 반복하고 72°C 10분간 elongation하는 중합효소 연쇄반응을 실시하여 258bp의 DNA product를 얻었다. 확인된 애벌레를 포르말린으로 고정 후 파라핀 블록으로 제작한 뒤 직접 H&E 염색을 통해 슬라이드 상에서 장기 및 세포를 관찰하였다. 이를 통해 석고병에 감염된 개체의 조직 사진을 평가하고 균사체를 탐색하였다.

나. PAS 염색을 통한 석고병 감염 개체의 균사체 염색 및 H&E 염색 사진과 비교

석고병 감염개체의 PAS 염색을 진행하였다. 과정은 다음과 같이 진행하였다. 파라핀을 모두 제거한 조직 슬라이드를 실온에서 5분간 Periodic Acid Solution에 담가 두었다. 그 뒤 3차 증류수를 이용해 washing 과정을 5번 반복 실시해주었다.

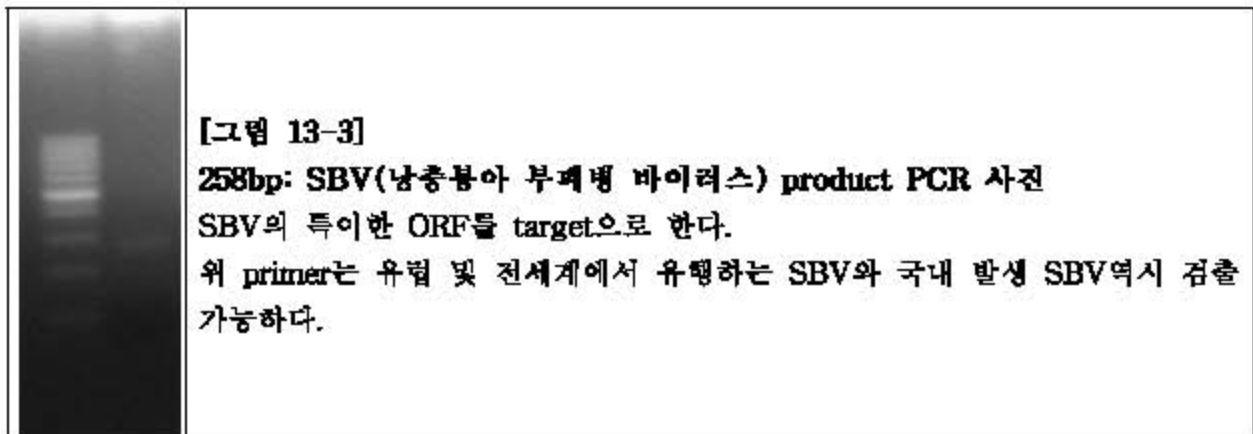
그 뒤 15분간 Schiff's Reagent 로 슬라이드를 담가주었다. 과정이 끝난 뒤 흐르는 수돗물로 5분간 washing 과정을 실시하여 주었다. 배경염색으로 Hematoxylin염색을 진행해 주었다. 다시 과정이 끝난 뒤 흐르는 수돗물로 5분간 washing 과정을 실시하여 주었다. 건조 과정이후 mounting 과정을 진행하였다.

염색이 끝난 슬라이드를 현미경하에서 조직 내 균사체를 찾아 확인하였다.

5. 남충봉아 부패병에 대한 조직 내 교집범 개발

가. 남충봉아 부패병 바이러스 진단 가능한 특이적인 프라이머 제작

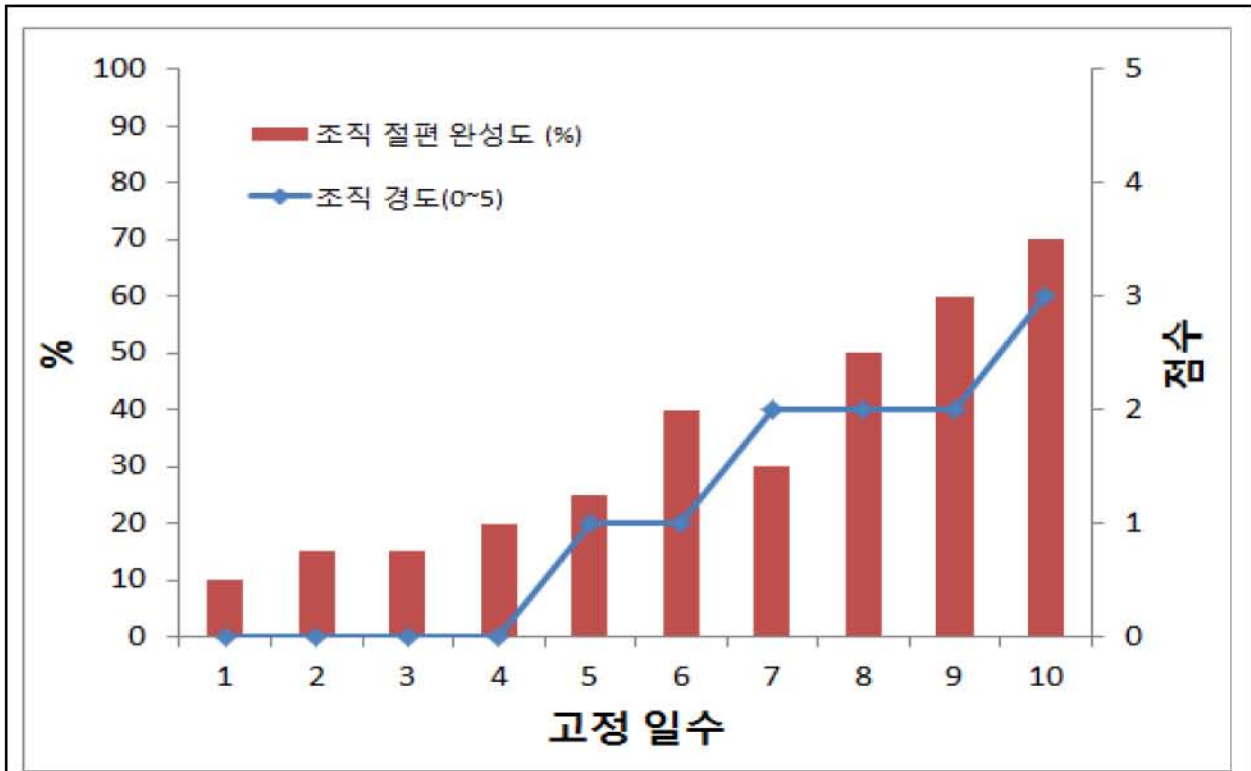
남충봉아 부패병이 발병한 농가의 에틸레와 성충의 RNA를 추출하여 양성 대조군으로 삼고 음성 대조군으로서 PBS 및 폐지 생식기 호흡기 바이러스의 RNA를 삼아 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.



나. 에틸레 성충 조직 제작 기법 확립 및 남충봉아 부패병 바이러스 특이 탐색자(probe) 제작



그림 13-4에서와 같이 다양한 조건을 통해 에틸레와 성충 조직을 고정하는 방법을 확인하였다. 결과적으로 7~10일 간의 포르말린에서 고정하는 것이 가장 확실한 방법임을 확인하였다.



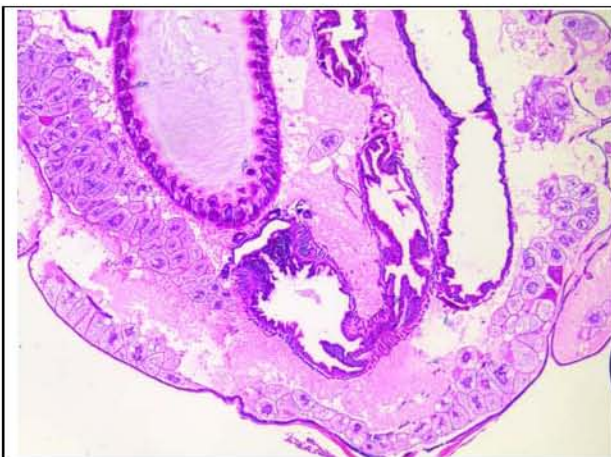
[그림 13-5] 고정 일수에 따른 꿀벌 조직 경도 및 조직 절편 완성도

*조직 절편 완성도 : 전체 100마리 개체를 조직으로 만들었을 때 성공적으로 섹션 작업에 성공하여 절편으로 완성된 %

*조직 경도 : 0~5 점수로 조직의 경화 정도에 따라 부여한다.

향후 실험에 사용할 모든 조직은 10일 간 포르말린 고정 이후 진행하였다.

다. 정상 에벌레 조직 및 꿀벌 성충 H&E 염색법 개발, 판독



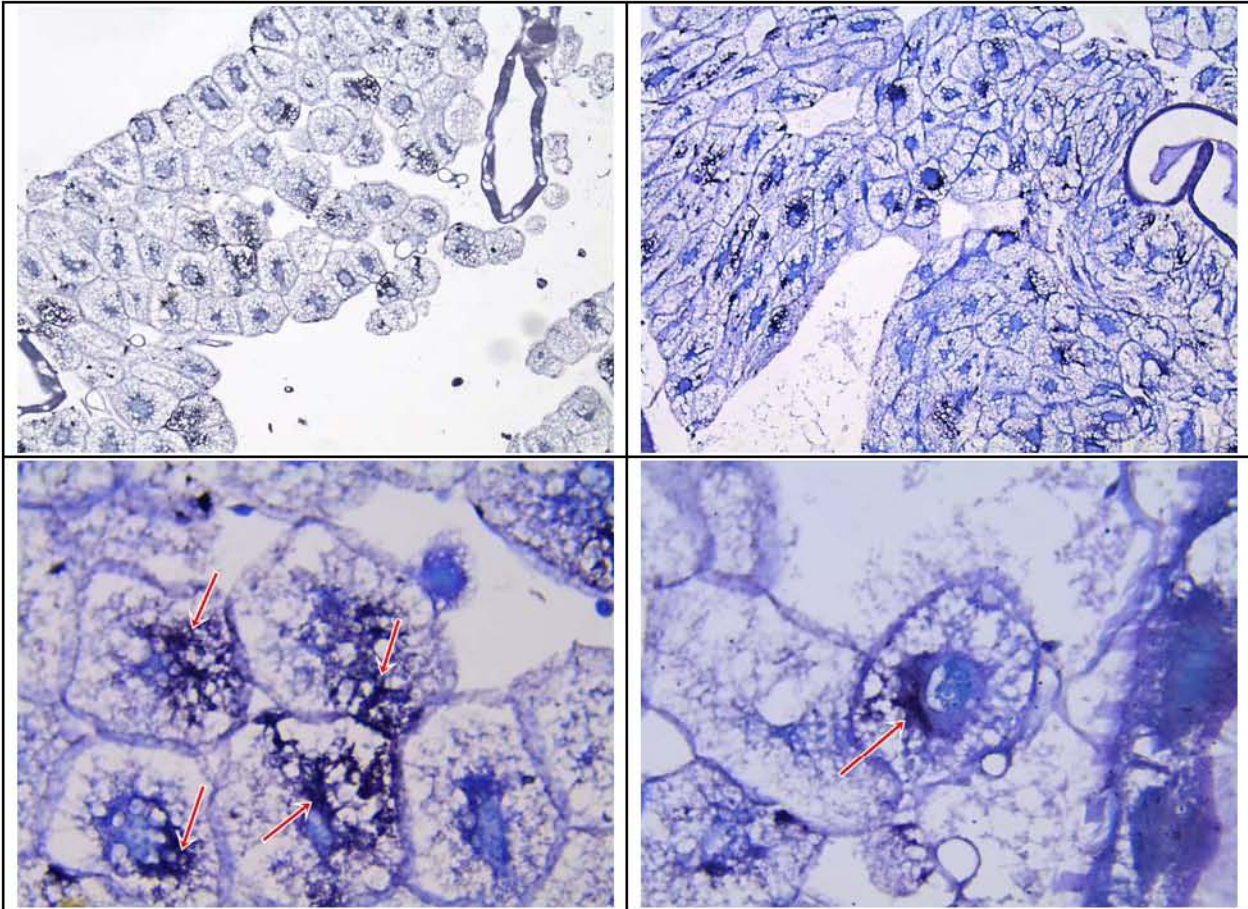
[그림 13-6] 에벌레 후미 부위



[그림 13-7] 성충 wing muscle region

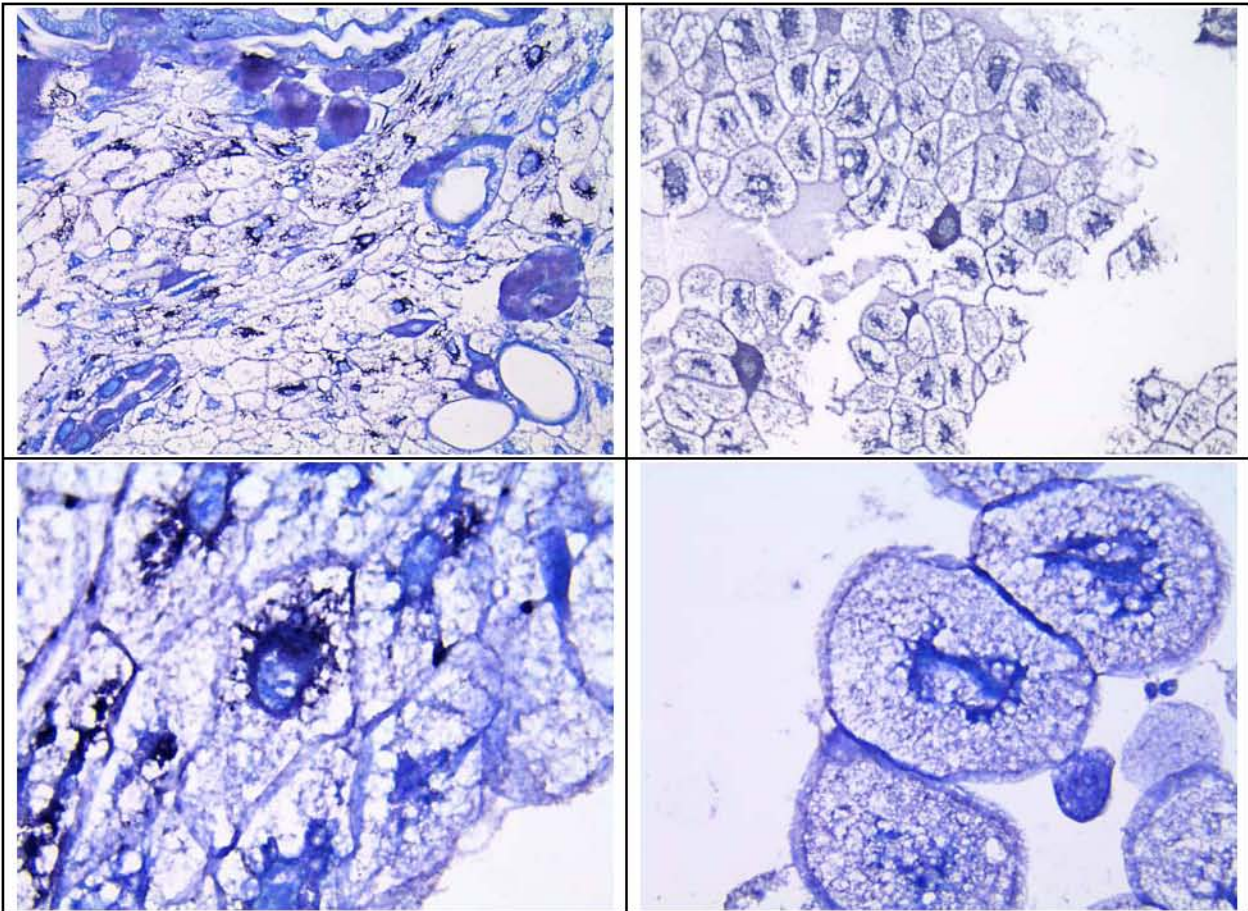
앞서 개발한 고정방법을 통해 생성된 조직 블록을 H&E 염색을 거쳐 슬라이드로 제작하였다. 염색된 조직은 각 장기와 조직은 병변 부위와의 비교를 위한 지표로서 보관하였다.

라. 조직내 교잡법을 이용한 애벌레에서 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산 검출



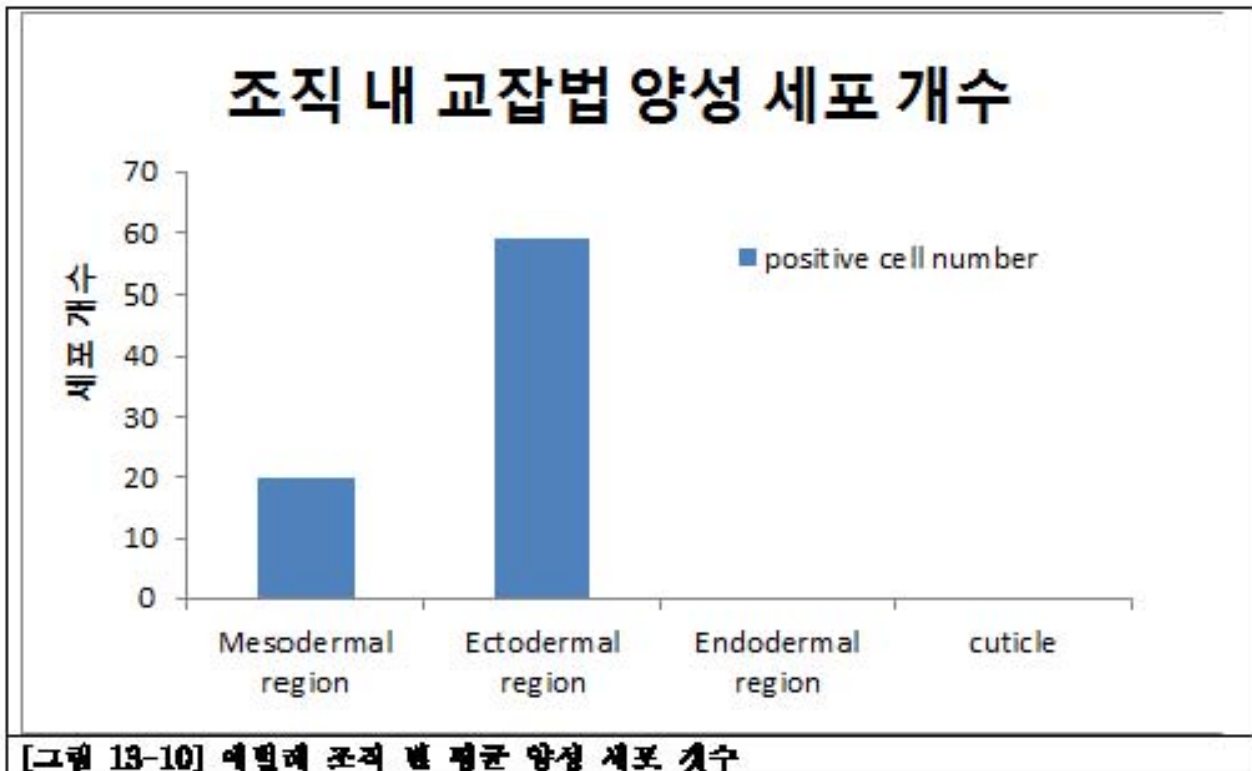
[그림 13-8] 조직내 교잡법을 통한 낭충봉아 부패병 바이러스 핵산의 검출

화살표에서 표시된 바와 같이 위 바이러스는 핵 내부가 아닌 세포질에 분포하는 것으로 밝혀졌다. 이들 세포는 꿀벌 애벌레가 분화하면서 외각으로 유도된 mesodermal cell 로 보이며 이들은 분열이 왕성한 세포로 알려져 있다. 바이러스는 위 사진에서 볼 수 있듯이 최외각 큐틴질이나 내강의 어떠한 세포에서도 검출되지 않았으며 오직 증배염과 외배염을 구성하는 세포층에서만 관찰되었다. 이는 바이러스에 감염된 애벌레가 성충이 되지 못하고 조직이 붕괴하는 병 인론을 뒷받침 해줄 수 있다.



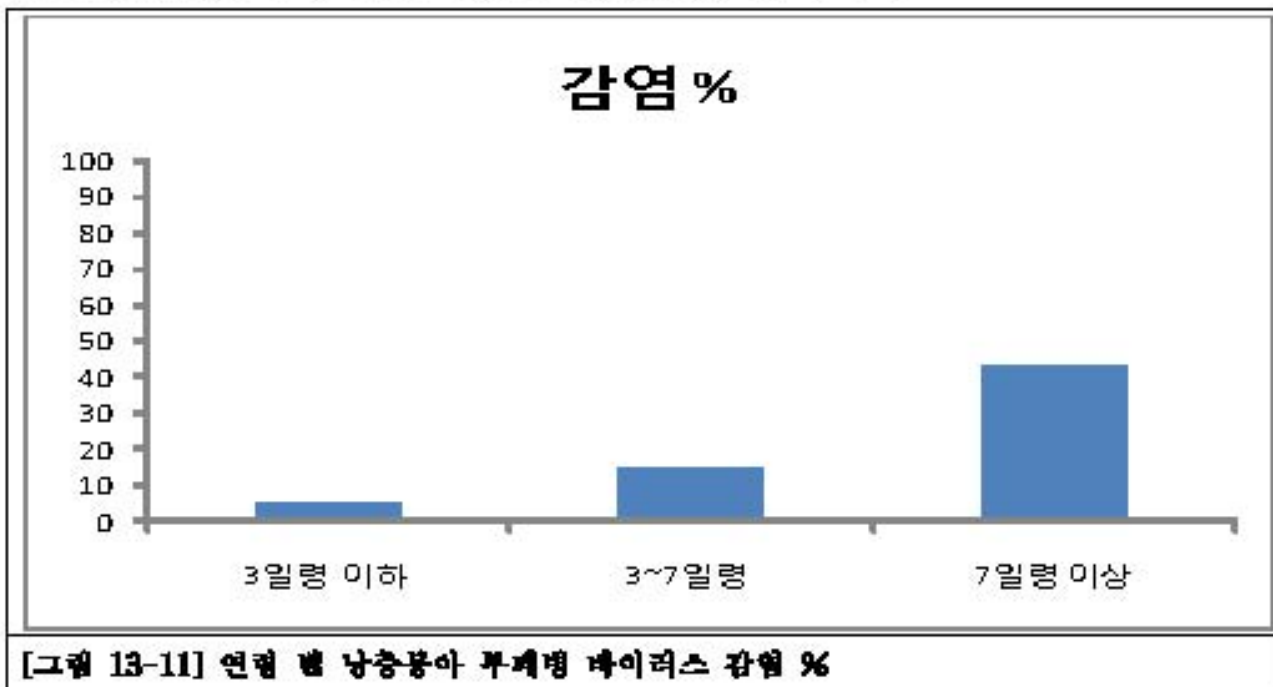
[그림 13-9] 조직내 교잡법을 통한 감염 개체(좌)와 비감염 개체(우) 비교사진

조직내 교잡법을 통해 애벌레가 바이러스에 감염되어 있는지 육안으로 확인할 수 있었다. 종료된 애벌레 조직은 현미경상에서 임의로 0.25mm^2 의 면적을 3곳 정하여 낭충봉아 부패병 바이러스에 대한 양성반응을 보이는 세포의 숫자를 세어서 애벌레 조직 내 주로 분포하는 세포와 기관을 찾아내었다.



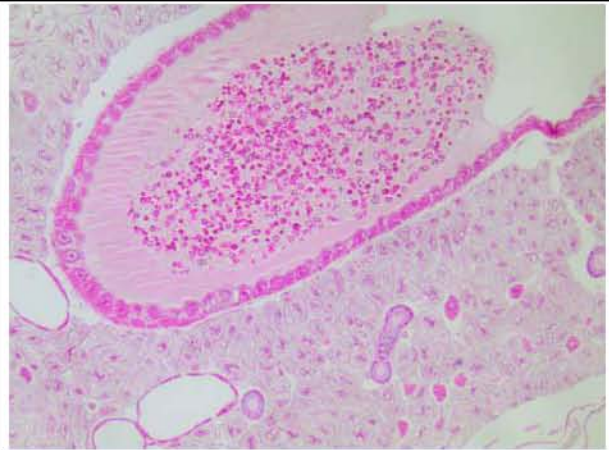
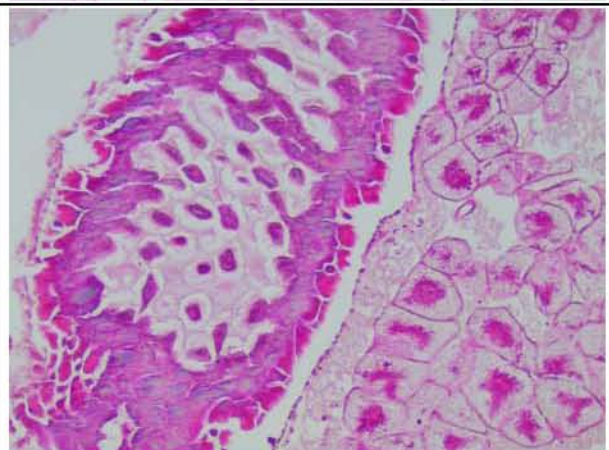
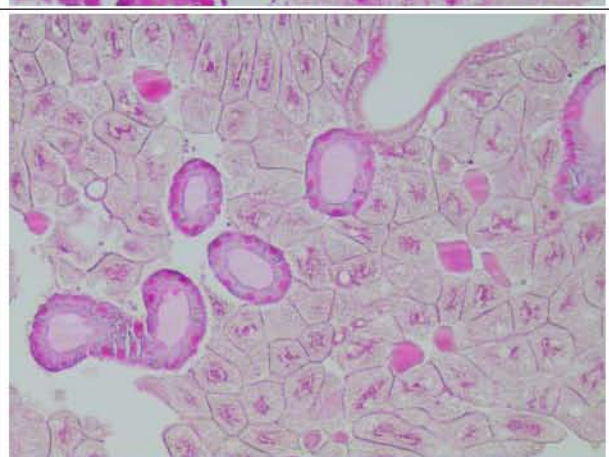
6. 자연감염 조직에서의 낭충봉아 부패형 바이러스의 분포와 조직 관독

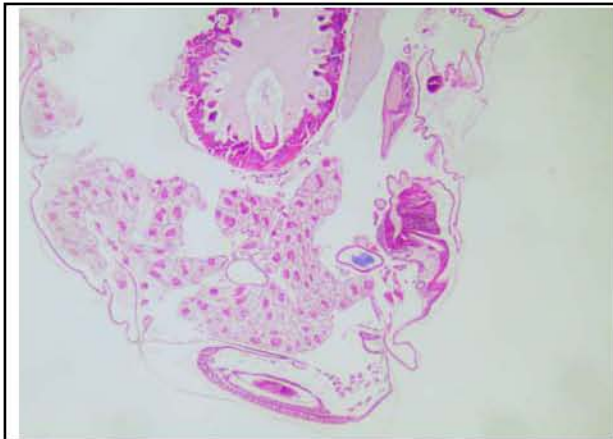
조직 내 교잡법을 통해 확인된 연령 별 감염 분포는 다음과 같다.



실험 결과 바이러스의 감염은 초기 3일령 이하에서도 가능한 것으로 확인되었다. 그러나 일령이 증가할수록 감염된 개체수가 증가하는 양상을 확인할 수 있었다.

감염된 에벌레의 조직을 H&E Staining을 통해 병변을 확인하였다. 발생 중인 에벌레의 각 기관과 세포의 병변 유무를 현미경 상에서(X40~200)에서 확인하였다.

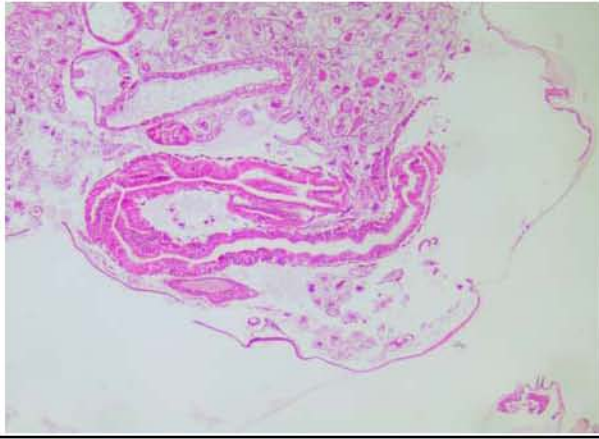
	<p>Midgut, epithelial cell, 감염된 에벌레의 소화기관 내 병변을 관찰하였다. 괴사되거나 재생되는 세포가 일정하게 관찰되었다.</p>
	<p>Ovarian tissue, 감염된 에벌레 조직 내 특이적인 병변은 보이지 않았다.</p>
	<p>Salivary gland, sporadic cell 감염된 에벌레의 조직 내에서 특이적인 병변은 관찰되지 않았다.</p>



Cranial part, midgut, fatbody cell, eyeball
조직 내 병변은 오직 Fat body cell의 괴사와 붕괴만이 관찰하였다.



Eyeball, 확대 사진
조직 내 특이적인 병변을 확인할 수 없었다.

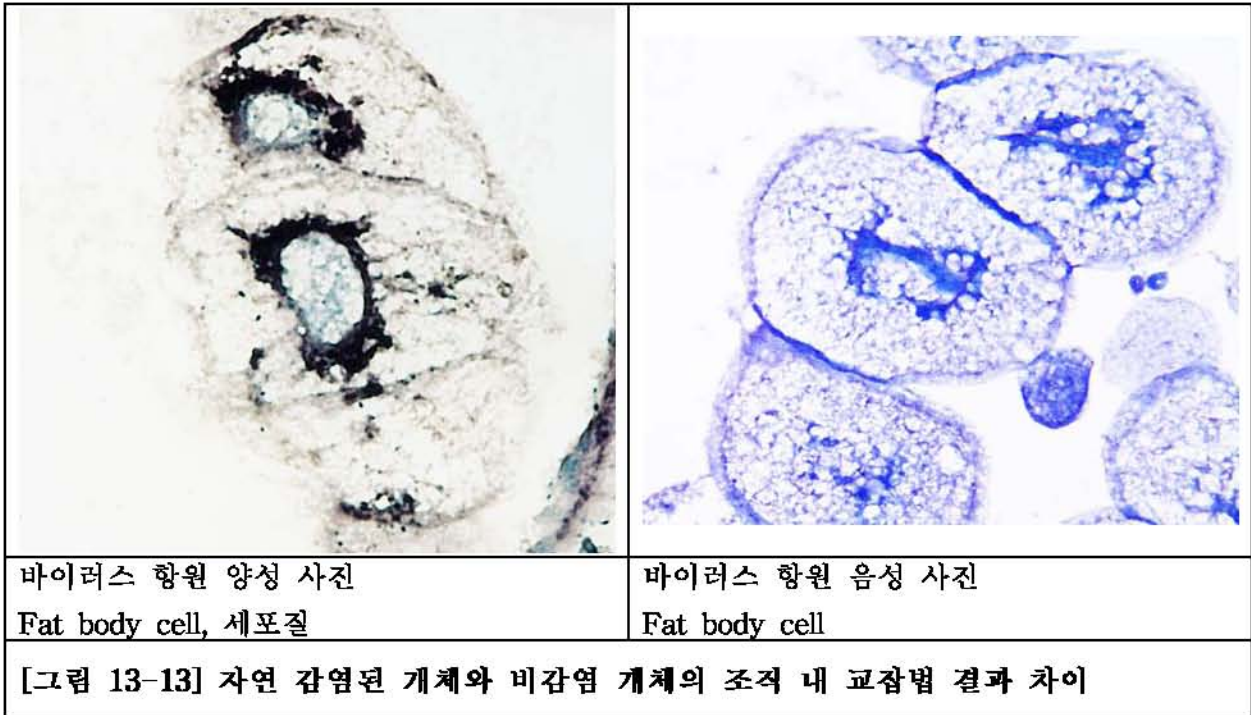


Midgut caudal part, 조직 내 특이적인 병변을 확인할 수 없었다.



Midgut caudal part, 확대 사진
조직 내 특이적인 병변을 확인할 수 없었다.

[그림 13-12] 감염된 개체의 조직에서 낭충봉아 부패병 바이러스의 항원이 검출된 기관과 세포



가. 3일령 이하 애벌레 조직 내 항원 분포

No.	Midgut, Epithelial cell	Salivary grand, sporadic cell	Fat body cell	Ovarian cell	Muscle	Tracheal end cell
1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	+	-
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-

표 13-1. 3일령 이하 애벌레 조직 내 항원 분포

나. 3~7일령 애벌레 조직 내 항원 분포

No.	Midgut, Epithelial cell	Salivary grand, sporadic cell	Fat body cell	Ovarian cell	Muscle	Tracheal end cell
1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	+	-
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	-	-	+	-
9	-	-	+	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-

표 13-2. 3~7일령 애벌레 조직 내 항원 분포

다. 7일령 이상 애벌레 조직 내 항원 분포

No.	Midgut, Epithelial cell	Salivary gland, sporadic cell	Fat body cell	Ovarian cell	Muscle	Tracheal end cell
1	-	-	+	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-
4	-	-	+	-	-	-
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-
7	-	-	+	-	-	-
8	-	-	+	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-
10	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-
13	-	-	+	-	-	-
14	-	-	+	-	-	-
15	-	-	+	-	-	-
16	-	-	+	-	-	-
17	-	-	+	-	-	-
18	-	-	+	-	-	-
19	-	-	+	-	-	-
20	-	-	+	-	-	-
21	-	-	+	-	-	-
22	-	-	+	-	-	-
23	-	-	+	-	-	-
24	-	-	+	-	-	-
25	-	-	+	-	-	-
26	-	-	+	-	-	-
27	-	-	+	-	-	-
28	-	-	+	-	-	-
29	-	-	+	-	-	-
30	-	-	+	-	-	-

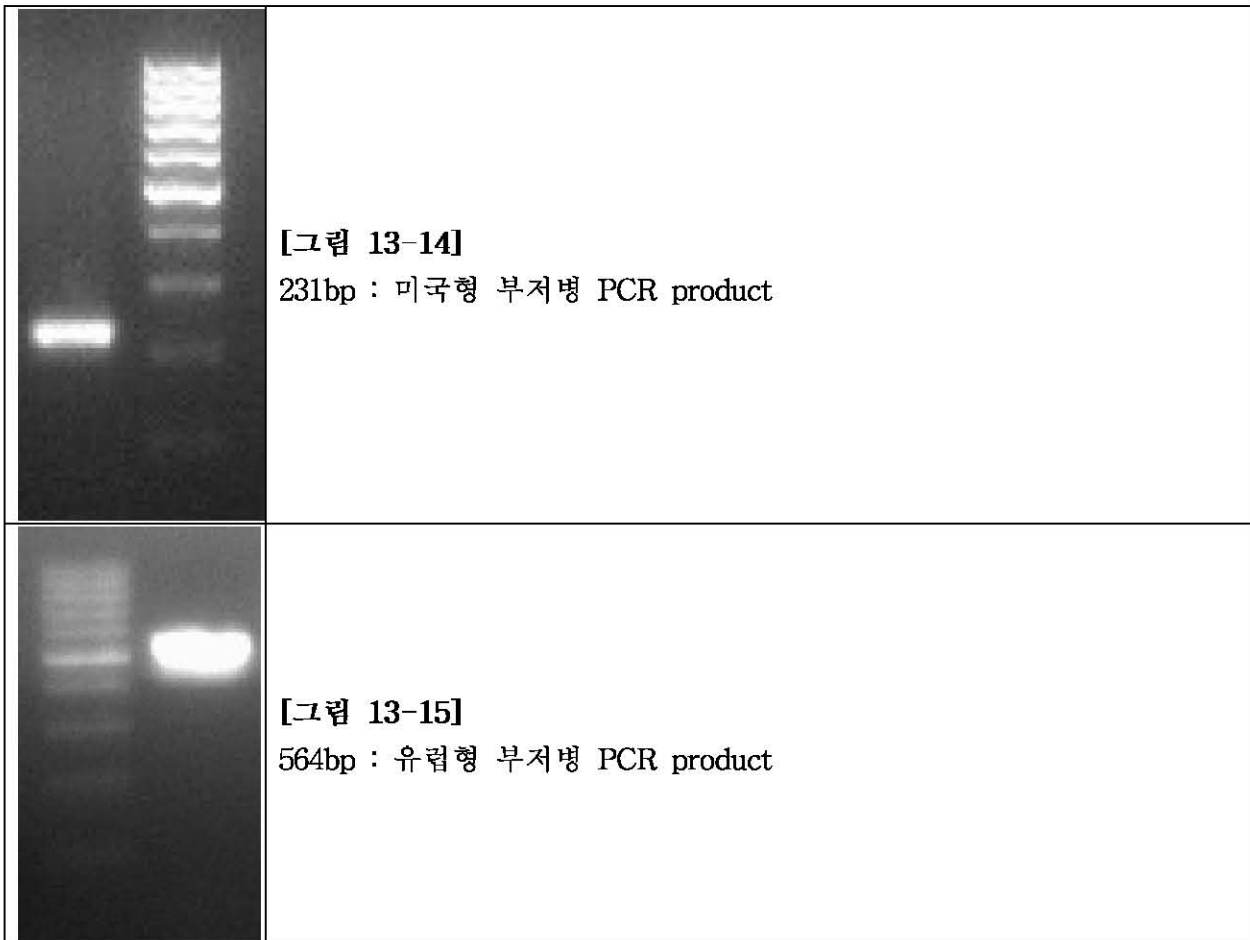
표 13-3. 7일령 이상 애벌레 조직 내 항원 분포

조직 내 교잡법을 통해 염색한 결과, 낭충봉아부패병 바이러스의 주요 숙주세포는 Fat body cell임을 확인할 수 있었다. 이는 H&E 염색을 통한 결과와 일치하는 결과로 낭충봉아 부패병이 발생한 애벌레에서 조직 내 증창이 발생하는 현상에 대한 설명이 될 수 있다.

한편 바이러스의 감염은 3일령 이전부터 가능한 것으로 보인다. 현재까지 바이러스의 애벌레 감염에 대한 명확한 근거가 없지만 성충 꿀벌에 의한 수직감염이 주요한 요인으로 추정된다. 그러나 본 실험에서 초기 연령의 애벌레에서 midgut 내 바이러스 항원이 검출되지 않아 oral route를 통한 바이러스 전파를 증명하는데 실패했다.

7. 부저병에 대한 조직 내 교잡법 개발 및 적용

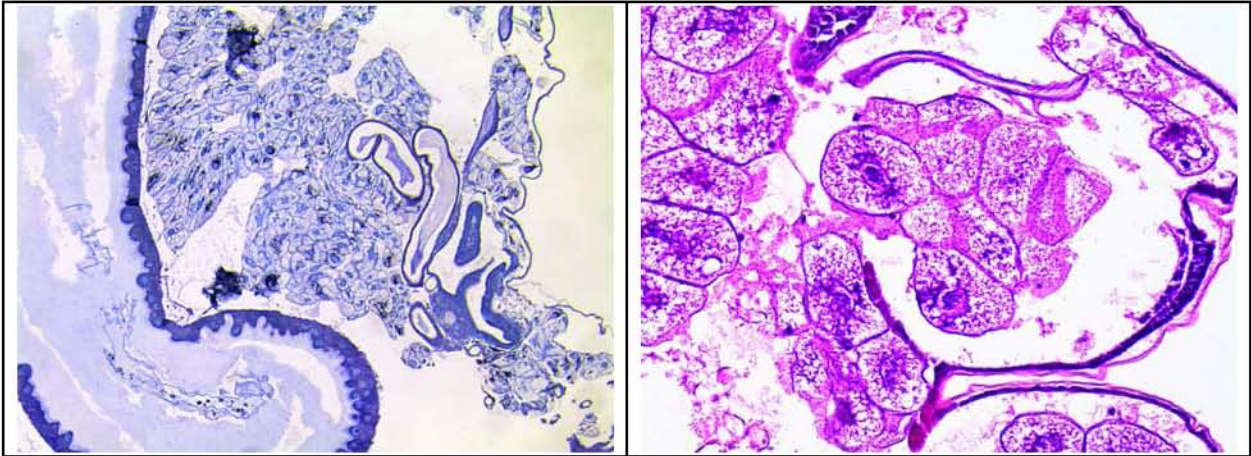
가. 부저병에 특이적인 진단 프라이머 제작



부저병이 발병한 농가의 에벌레와 성충의 RNA를 추출하여 양성 대조군으로 삼고 음성 대조군으로서 PBS 및 돼지 생식기 호흡기 바이러스의 RNA를 삼아 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

나. 조직 내 교잡법을 이용한 에벌레에서 부저병 감염 확인

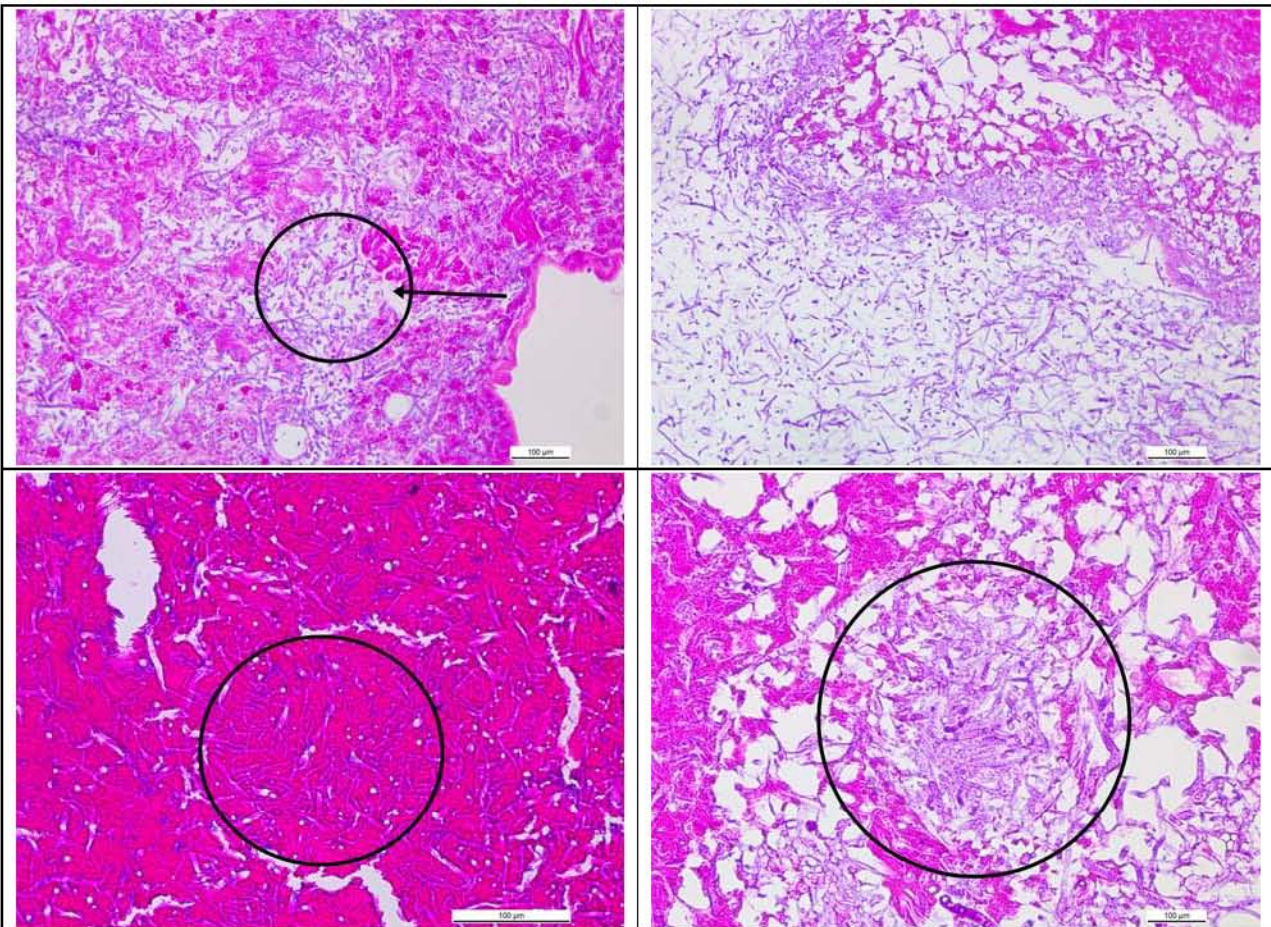
위와 같은 조직 내 교잡법을 실시하여 꿀벌 에벌레 내에서 부저병 유발 세균의 조직 내 분포를 확인할 수 있었다. 부저병 유발 세균의 조직 내 분포 정도와 그에 따른 병변 차이 비교 및 미국형과 유럽형 부저병 간의 병인론 차이와 병변 차이를 비교하였다.



[그림 13-16] 조직내 교잡법을 통한 부저병 분포(좌) 부저병 감염 개체의 H&E 사진 (우)

8. 석고병에 대한 PAS 및 H&E 염색 결과

가. 석고병에 감염된 개체의 H&E 염색결과



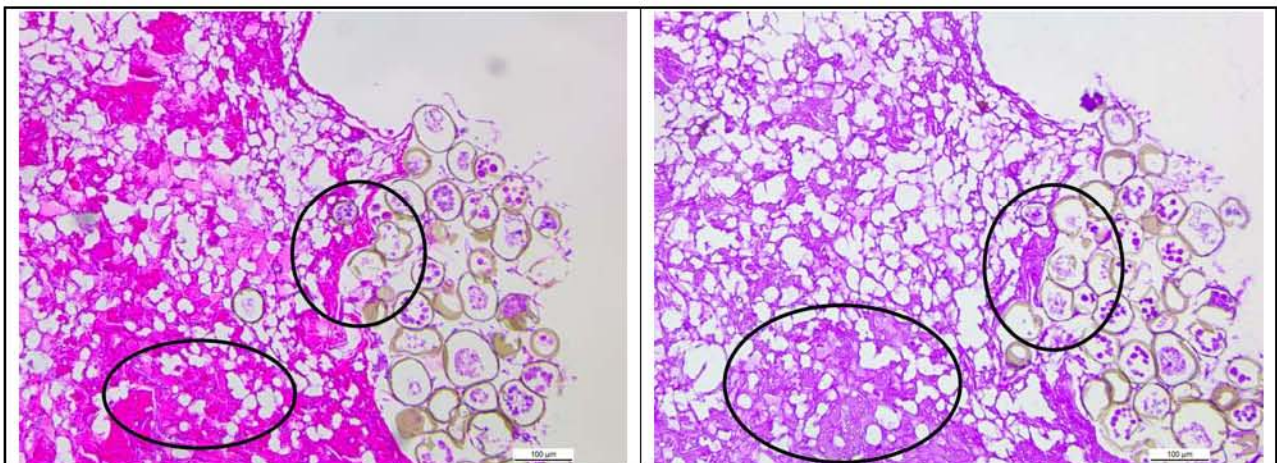
[그림 13-17] 석고병에 감염된 에벌리의 H&E 사진

석고병에 감염된 애벌레의 병변은 육안으로 관찰된 것과 판이하게 달랐다. 애벌레의 조직 전반에 걸쳐 균사체가 관찰되었으며 애벌레는 외부 큐티클 층만으로 그 형태만 유지된 상태가 대부분이었다. 균사체는 사진에서 보는 바와 같이 조직 내부에도 침투해 있었으며 내강 및 외부 큐티클 층 넘어 조직 외부까지 전반적으로 증식해 퍼져있었다.

감염개체에서 세포는 더 이상 형태를 유지하지 못하였다. 이미 애벌레의 대부분의 세포를 구성하는 모든 fat body cell이 괴사된 상태였다. 꿀벌의 애벌레가 15일간 지속적으로 발생과정을 통해 성체로 성장해나가는 시기임을 생각해보면 이 석고병의 균사체가 아주 치명적일 수밖에 없음을 확인할 수 있었다.

균사체의 형태는 전형적인 곰팡이 형태로서 Fat body cell과 아주 쉽게 구분되는 이질적인 형상이었다. 이로서 석고병 감염 개체의 조직학적인 병변을 확인할 수 있었다.

나. 석고병 균사체의 PAS 와 H&E 염색 사진 비교



[그림 13-18] Serial section을 통한 균사체의 모습, H&E 사진 (좌), PAS 사진 (우)

PAS 염색은 일반적인 곰팡이 염색에 사용되는 방법이다. Glycogen을 염색하기에 균사체를 조직에서 확인하기 쉽게 만들어준다.

본 연구과제에서도 이러한 염색의 유용한 장점을 확인할 수 있었다. 사실 석고병 감염개체의 경우 조직 전반에 걸친 균사체의 증식으로 인해 H&E염색에서도 쉽게 균사체를 관찰할 수 있다. 그러나 PAS 염색은 보다 명확하게 균사체를 구분할 수 있는 방법으로서 가치가 있다. 위에서 그림 13-18에서 볼 수 있듯이 일련의 연속적인 슬라이드 제작을 통해 관찰할 수 있는 조직 절편에서 PAS 염색은 H&E 염색에서보다 명확하게 균사체의 모습을 구분할 수 있다. 따라서 석고병의 발병 초기 균사체가 조직 내 증식하기 전에 보다 쉽게 질병의 진단에 유용하게 쓰일 수 있으리라 짐작한다.

제 14 절 꿀벌 병원성 바이러스 4종 특이 단백질들의 대량 생산

1. 서론

알려진 꿀벌의 모든 병원성 바이러스들은, 양성의 단일가닥 RNA (positive single strand RNA)를 유전체로 가지고 있으며, 다른 Retrovirus들의 경우와 달리, 꿀벌의 유전체(DNA)에 삽입되어 DNA로 변형되지 아니하고("no DNA-stage"), 꿀벌에 감염 이후, 스스로 바이러스의 복제형인 음성 단일가닥 RNA (negative single strand RNA)를 만들고, 이를 주형으로 대량의 바이러스 유전체(양성 단일가닥 RNA)를 생산하는 것으로 추측되고 있다.

RNA의존 RNA 중합효소(RdRP; RNA dependent RNA Polymerase)는 많은 RNA 바이러스 중 "no DNA-stage"의 바이러스에서만 발견되는 효소로써, 양성가닥 RNA로부터 음성가닥 RNA를, 그리고 음성가닥 RNA로부터 다시 양성가닥 RNA (유전체)를 생산하는 기능을 담당한다. 그러나 DNA의존 DNA 중합효소 (복제), DNA의존 RNA 중합효소 (전사), 그리고 RNA의존 DNA중합효소 (역전사효소)의 경우와 달리, RdRP의 기능에 대한 분자적 기작은 어느 하나 분명한 것이 밝혀지지 못하고 있다.

한편, C3G Peptidase는 바이러스의 양성가닥 RNA 유전체가, 꿀벌의 mRNA처럼 기능하여 만들어 낸 거대 polypeptide의 특정 아미노산 서열 부분들을 인식하고, 절단하는 효소이다. 이후 절단된 작은 polypeptide들은 각기 바이러스의 구조 단백질 (VP1, VP3 등), 비구조 단백질 (Non-structural proteins; RdRP, C3G)의 개별 단백질로 기능하게 되나, 이 C3G의 특이 인식/절단 부위는 현재 여러 가설만 제기된 수준이며, 거대 polypeptide가 최소 6개 이상의 개별 polypeptide로 각기 절단되어 각기 특이 단백질로 기능하게 하는데 그 절단부위의 보존 서열 등 많은 의문점들이 아직 미해결로 남아 있다.

현재까지 꿀벌 바이러스에 대항하기 위한 연구들은 주로 꿀벌바이러스 특이 유전자 검출과 검량에 집중되어 왔으며, Ultra-rapid Real-time PCR (Lim et al., 2013), Ultra-Fast High-Performance PCR (Lim, 2013), Real Time PCR (Lee et al., 2005), Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP; No et al., 2010) 등이 그것들 이라 할 것이다. 이들 방법들은 모두 유전자 기반의 분자진단법으로 실험실 환경에서 매우 민감한 결과를 보이고 있으나, 양봉 현장에서 즉석 진단에 사용하기에는 어려움이 많은 수준이다. 현재의 기술수준에서 현장 진단에 가장 근접한 방법은 Immunochromatography법이라 생각되며, 이를 위한 개별 바이러스에 대한 특이 항원/항체의 개발은 또한 시급한 요구라 판단된다.

따라서 본 연구에서는 대장균 발현시스템을 이용하여 DWV의 특이 단백질들 가운데 구조 단백질 2종(VP1과 VP3)과 비구조 단백질 2종 (RdRP와 C3G)의 대량생산을 목표로 하였다. 이들

4종의 특이 단백질들은 각기 특이 항체 생산을 위한 항원들로 사용될 수 있을 뿐 아니라, DWV의 생존 및 감염기작을 밝힐 수 있는 연구재료로써 중요하다. 또한 대상으로 한 2종의 효소들은 효소기능 및 그 저해에 대한 연구를 통하여; 꿀벌에 대한 DWV 감염을 저해시킬 수 있는 항바이러스 저해제 개발에서 주요 역할을 할 것으로 기대하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료의 확보 및 RNA의 순수분리

DWV에 감염되었다고 의심되는 꿀벌(*Apis mellifera* L.)-시료를 경기대학교 양봉장에서 확보를 하였으며, DWV 감염사실은 추후 특이 RT-PCR의 방법으로 확인하였다. RNA 순수분리는 꿀벌 시료 3수에 Total RNA Extraction kit(Intron Bio Inc., Korea)의 1ml lysis buffer 와 200 μ l Chloroform (Daejung Inc., Korea)를 첨가 후, MagNA Lyser Green Beads (Roche, Switzerland)를 사용하여 6,000RPM에서 60초의 조건으로 파쇄를 수행함으로 시작하였다. 이후 과정은 Total RNA Extraction kit (Intron bio, Korea)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였고, 추출된 전체 RNA는 OD 260nm에서 농도를 측정하고, Reverse Transcription 과정에 사용하였으며, 잔여 RNA는 초저온냉동고(-70°C이하)에 보관하였다.

나. Reverse Transcription

추출된 전체 RNA중 3,000ng을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 3,000ng의 전체 RNA가 포함된 용액에 100pmol oligo-dT를 첨가하여 -65°C에서 10분간 정치하였다. 정치 후; 즉시 ice로 옮겨 5분간 정치하였고, 이 반응액에 100mM DDT, 10mM dNTP (각 2.5mM), RNase inhibitor, Rocket Script Reverse Transcriptase (10,000U), 5X reaction buffer를 첨가하여 42°C에서 60분간 정치하여 역전사반응을 수행하였다.

다. Molecular cloning of each protein gene from DWV

GenBank에 등록된 DWV의 유전체 서열 (Accession No. JX878305.1)을 바탕으로 각 단백질 부분의 유전자가 증폭되도록 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 의뢰하였다(Table 14-1).

역전사반응을 통해 제작된 cDNA를 주형으로, 이들 primer쌍을 사용하여 DWV의 각 유전자들을 PCR 증폭하였다. 이때 각 PCR의 조성은, 2.5U Taq DNA Polymerase (GeneClone, Korea), 2.5mM dNTPs, 10×PCR buffer (25mM MgCl₂), 각 10pmol primer set로 하였고, 각 PCR의 조성은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 1분을 1cycle로 하여, 총 35cycle 반복수행하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 post-extension을 수행하였다.

증폭된 각 유전자들은 아가로오스 젤 전기영동을 통하여 그 PCR 산물의 크기를 확인하였으며, 크기가 확인된 PCR산물들은 각기 pBlueXcm I vector (GeneClone, Korea)에 삽입하여 T-vector cloning을 수행하였다. 선별된 재조합 DNA들은 DNA 염기 서열 분석을 의뢰하였으며(SolGent, Korea), 염기서열이 확인된 재조합 DNA들은, 제한효소로 절단하여, 각기 발현 vector인 pET32a(+) (Novagen, Germany) 그리고 pMAL-C2 (NEB, UK) Expression vector에 삽입시켰다(Fig 14-1; Fig 14-2).

Table 14-1. Information of deformed wing virus (DWV) specific protein primer set

Target	Primer Name	Sequence	reference
DWV	DWV-VP1-F	GGGGGATCCTTAATAGTAGGTTATG TGCCT	This study.
	DWV-VP1-R	GGGGTCGACATTCAAAATCTTGAAC ATGCG	
	DWV-VP1-vp3-F	GCGGGATCCGGATCTGYTTCCGAYCA AAT	
	DWV-VP1-vp3-R	AGAGTCGACCGCAATAGGGCCCTCAG GCA	
	DWV-RdRp-F	GGGGGATCCCAGTTAATGAGGAAAA AGGG	
	DWV-RdRp-F	TCGGTCTGACTGAGTCCAATTCGTCGT TCC	
	DWV-polyC3G-F	GCGGGATCCACTAAGCCTCAGGGATC AA	
	DWV-polyC3G-R	AGAGTCGACAGCTAGCTTTGCATCCA CT	

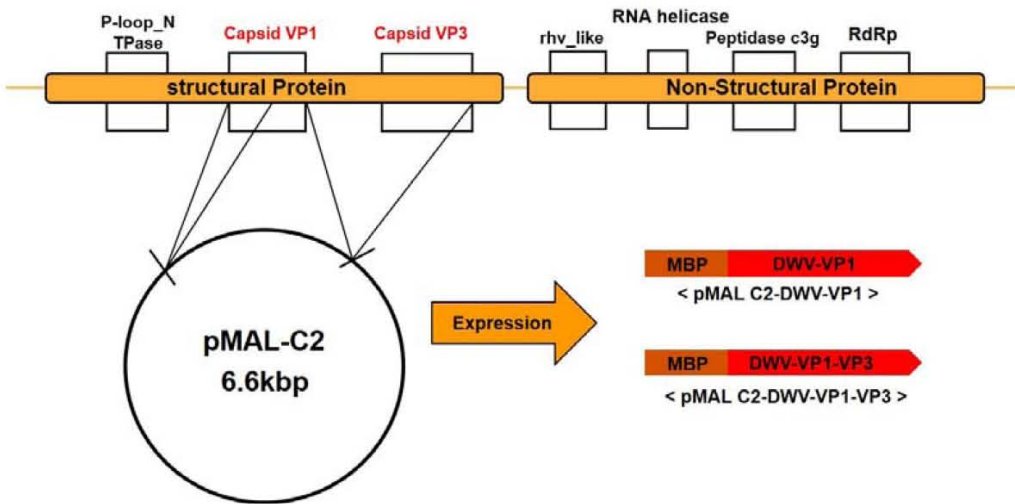


Figure 14-1. The genetic map of Deformed Wing Virus and basic strategy of molecular cloning for DWV VP1 / DWV VP1-VP3 using pMAL-C2 vector.

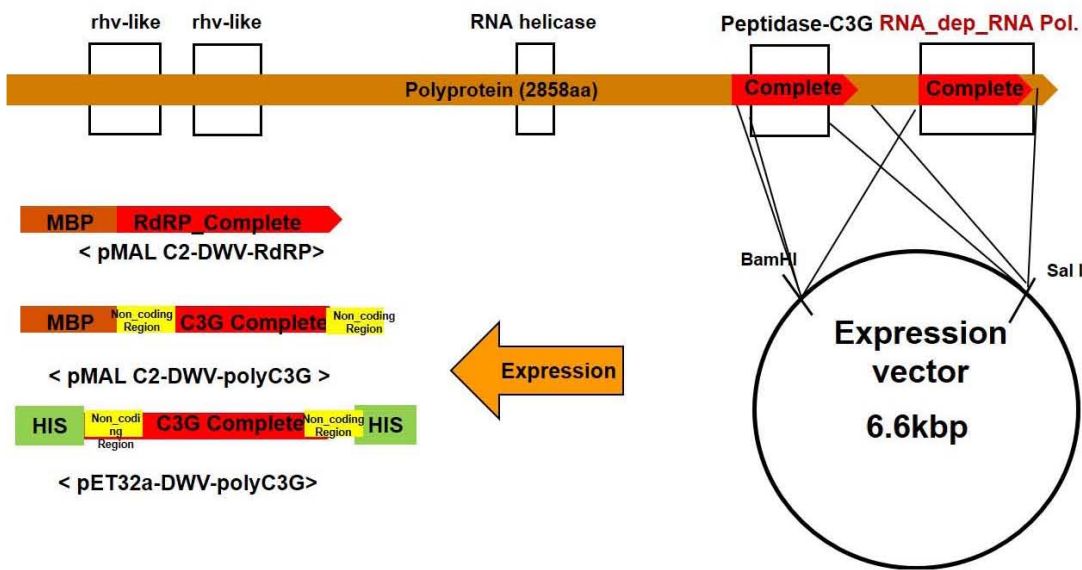


Figure 14-2. The genetic map of DWV and strategy of molecular cloning for DWV Peptidase_C3G / RdRP using pET32a or pMAL vectors.

라. 재조합 DWV 단백질들의 발현

재조합된 DWV의 각 유전자 DNA 염기서열과 추론된 아미노산 서열들을 GenBank에 보고된 DWV의 유전체 서열(Accession No. JX878305.1)과 비교 검토한 후, DWV-VP1, DWV-VP1-VP3, DWV-polyC3G, DWV-RdRP라 명명하였다. 이들 유전자들은 각기

pMAL-c2 vector와 pET32a vector에, 제한효소 절단 및 연결을 통하여 재조합시켰으며 기본 발현조건으로 재조합 단백질 발현을 유도하였다.

각 재조합 단백질들의 발현용 대장균 숙주는 *Escherichia coli* BL21(DE3)을 사용하였다. 해당 재조합 단백질의 발현 유도는 정체기에 들어선 각 대장균 배양액(5ml)을 새로운 배지와 1/25의 배율로 희석한 후 Sub-culture를 통하여 OD-600값이 0.6에 도달하였을 때 발현 유도제인 isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG)을 최종농도 0.6mM이 되도록 첨가하였다. 이후 37°C에서 150RPM의 진탕조건으로 6시간 호기 상태에서 유도 배양하였다.

유도 배양된 각 대장균 배양액은 50 ml 원심분리관에 분주하여; 3,000RPM에서 15min, 4°C의 조건에서, S750-4B rotor를 사용하여 원심 분리하였으며(Union 32R, Hanil Inc., Korea), 각 tube당 40ml PBS를 사용하여 2회의 washing 과정을 거친 후, 상층액을 완전히 제거하고, 최종적으로 10ml PBS로 부유시켰다. 이 부유액은 초음파 분쇄기인 VCX 500 (Sonic & Materials Inc., USA)에 S&M 1000 rode를 장착하고, 40% Amplitude, pulse on 0.5 sec, pulse off 0.5 sec, running time 1min 30sec의 조건으로 세포를 분쇄하였으며, 이 조건에서 세포 부유액이 맑아진 것을 확인하였다.

세포 분쇄액은 4°C의 조건에서 3,000RPM에서 15분간 S750-4B rotor를 사용하여 재차 원심 분리하였으며(Union 32R, Hanil Inc., Korea), 이 중 상층액을 새로운 튜브에 옮기고 단백질 정제에 사용하였다. 이 중 일부는 발현 여부 확인을 위하여, 5 \times probe buffer를 가한 후, 99°C에서 10분간 열처리하고, 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 전기영동 분석을 수행하였다.

마. DWV 재조합 단백질의 정제

SDS-PAGE에서 과발현이 확인된 재조합 단백질 (pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRP, pET32a-DWV-polyC3G)들은 각기 대량생산 및 단백질 순수분리를 수행하였다.

pET32a-DWV-polyC3G의 경우, 재조합 단백질의 N-말단 및 C-말단에 His tagging이 되어 있기에, Ni⁺ column (His trap HP, 1ml, GE Healthcare, USA)을 사용하여 정제를 진행을 하였다.

먼저 His trap HP를 AKTA Start system (GE Healthcare, USA)에 장착하고, 20ml His-washing solution (20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 40mM imidazole, pH 7.4)을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며, His trap HP를 통과하여 나온 His-washing solution이 UV-detector의 관찰하에 평형에 이르게 됨을 확인하였다. 이후 10ml

세포 분쇄액을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며(His trap HP를 통과하여 나온 여과액은 수집하고 재사용), 이어 동량 10ml의 His-washing solution으로 세척하였다. 이후 동량 10ml의 His-Elution solution (20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 500mM imidazole, pH 7.4)을 투입하였으며, 추출되는 단백질들은 UV detector의 관찰 하에, 각 1ml씩 fraction collector로 수집하였다. 각 fraction의 단백질양은 UV detector로 관찰할 때, 일반적으로 3ml (3번 fraction)에서 5ml (5번 fraction)까지 급히 증가하였으나, 이후 급히 감소하였다.

pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRP의 경우, 발현된 재조합 단백질의 N-말단 부위에 Maltose binding protein (MBP)가 있고, 재조합체는 이와 융합단백질의 형태로 연결되기에, Maltose 및 MBP Column (MBP trap HP, 1ml, GE Healthcare, USA)을 사용하여 정제를 진행하였다.

먼저 MBP trap HP를 AKTA Start system (GE Healthcare, USA)에 장착하고, 20ml MBP-washing solution (20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.4)을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며, MBP trap HP를 통과하여 나온 MBP-washing solution이 UV-detector의 관찰하에 평형에 이르게 됨을 확인하였다. 이후 10ml 세포분쇄액을 flow rate 0.5ml/min의 속도로 system내에 주입하였으며(MBP trap HP를 통과하여 나온 여과액은 수집하고 재사용), 이어 동량 10ml의 MBP-washing solution으로 세척하였다. 이후 동량 10ml의 MBP-Elution solution(20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM maltose, pH 7.4)을 투입하였으며, 추출되는 단백질들은 UV detector의 관찰하에, 각 1ml씩 fraction collector로 수집하였다. MBP-trap의 경우도 각 fraction의 단백질양은 UV detector로 관찰할 때, 일반적으로 3ml (3번 fraction)에서 5ml (5번 fraction)까지 급히 증가하였으나, 이후 급히 감소하였다.

3. 결과 및 고찰

가. DWV유전자들에서 유래된 재조합 단백질의 염기서열 분석

DWV의 각 유전자들은 cDNA 주형 및 해당 특이 primer쌍(Table 14-1)을 사용하여 PCR 증폭함으로써 얻을 수 있었다. 이들 PCR산물은 각기 T-vector cloning하여 유전자를 확보하였으며, 각기 pBX-DWV라 명명하고, 각기 염기서열 결정을 의뢰하였다.

pBX-DWV clone들의 염기서열은 각기 primer 제작 시 사용했던 DWV Complete sequence (Accession No. JX878305.1)와 비교 분석을 수행하였으며, 그 결과 확보된 DWV 구조단백질인 Capsid protein VP1의 염기서열 (GenBank accession No. KP739938.1)은 GB-JX878305.1의

그것과 97% (791/818)의 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 100%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig 14-3, Fig 14-7).

확보된 Capsid protein VP1+VP3 (GenBank accession No. KP751410.1)의 경우, GB-JX878305.1의 그것과 98% (1145/1167)의 염기서열 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig 14-4, Fig 14-8).

한편, 확보된 DWV 비구조단백질인 RdRP (RNA dependent RNA polymerase)의 염기서열 (GenBank accession No. KP739937.1)은 GB-JX878305.1의 그것과 96% (832/863)의 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig 14-5, Fig 14-9).

또한, 확보된 DWV 비구조단백질인 C3G (C3G peptidase)의 경우, GB-JX878305.1의 그것과 100% (828/828)의 염기서열 상동성을 보였으며, 이 염기서열을 근거로 추론된 아미노산 서열의 비교 분석에서는 99%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다(Fig 14-6, Fig 14-10).

Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome

Sequence ID: [gbJX878305.1](#) Length: 10114 Number of Matches: 1

Range 1: 2993 to 3810 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1362 bits(737)	0.0	791/818(97%)	0/818(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTAATAGTAGGTTATGTGCCTGGTTTGACAGCATCTTTGCAACAGCAAAATGGACTATATG			60
Sbjct 2393	TTAATGTAGGTTATGTGCCTGGTTTGACAGCATCTTTGCAACAGCAAAATGGACTATATG			3052
Query 61	AAATTGAAGTCATCAAGTTATGTAGTATTTGATTTACAAGAAAAGTAATAGCTTTACTTTT			120
Sbjct 3053	AAGTTGAAGTCATCAAGTTATGTAGTATTCGATTTACAAGAAAAGTAATAGCTTTACTTTT			3112
Query 121	GAGBTACCATATGTTTCATATAGACCATGGTGGGTGCGTAAGTATGGTGGCAATTATTTA			180
Sbjct 3113	GAGBTACCATATGTTTCATACAGACCATGGTGGGTGCGTAAGTATGGTGGCAATTATTTA			3172
Query 131	CCCTCGTCAACTGACGCTCCTAGTACATTATTTATGTATGTGCAGGTTCCGTTGATACCT			240
Sbjct 3173	CCCTCGTCAACTGACGCTCCTAGCACATTATTTATGTATGTGCAGGTAACGTTGATACCT			3232
Query 241	ATGGAAGCTGTTTCAGATACTATTGATATCAATGTGTACGTGCGGGGCGGTAGTTCATTT			300
Sbjct 3233	ATGGAAGCTGTTTCAGATACTATTGATATCAATGTGTACGTACGGGGCGGTAGTTCGTTT			3292
Query 301	GAAGTTTGTGTTCCAGTCCAACCTAGTTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATCTTA			360
Sbjct 3293	GAAGTTTGTGTTCCAGTCCAACCTAGTTTAGGTTTGAATTGGAATACAGACTTTATTTTG			3352
Query 351	CGTAATGACGAAGAATATAGGGCTAAGACAGGTTATGCACCATATTATGCTGGAGTGTGG			420
Sbjct 3353	CGTAATGACGAAGAATATAGGGCTAAGACAGGTTATGCACCATATTATGCAGGAGTGTGG			3412
Query 421	CATAGCTTCAATAATAGTAATTCCTTGTGTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATT			480
Sbjct 3413	CATAGCTTCAATAATAGTAATTCCTCGTTTTAGGTGGGGATCTGCTTCTGATCAAATT			3472
Query 431	GCCCAGTGGCCGACAATTCAGTACCAAGGGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAGGGAT			540
Sbjct 3473	GCTCAGTGGCCGACAATTCAGTGCCAAGAGGTGAGCTAGCTTTCTTACGAATTAGGGAT			3532
Query 541	GGAAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACCAACCTTGGCGTACGATGGTTGTTTGGCCCTCTGGT			600
Sbjct 3533	GGAAAAGCAAGCTGCTGTAGGAACCAACCTTGGCGTACAAATGGTTGTTTGGCCCTCTGGT			3592
Query 631	CATGTTTATAATATTGGTATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGCTTGCACAG			660
Sbjct 3593	CATGTTTATAATATTGGCATACCTACGTATAATGCTGAACGAGCTCGCCAGCTTGCACAA			3652
Query 651	CATTTATATGGTGGTGGATCATTAAACCGATGAGAAGGCCAAACAATTATTTGTTCCCTGCT			720
Sbjct 3553	CACTTATATGGTGGCGGGTCATTAACTGATGAGAAGGCCAAACAATTATTTGTTCCCTGCT			3712
Query 721	AATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGTAATGGAAATCCGGTATGGGAAGTTATGCGTGCA			780
Sbjct 3713	AATCAACAAGGACCTGGTAAGGTAAGCAATGGAAATCCAGTATGGGAAGTTATGCGGCGG			3772
Query 731	CCATTGGCAACACAGCGTGCGCATGTTCAAGATTTTGA 818			
Sbjct 3773	CCATTGGCAACACAGCGTGCGCATGTTCAAGATTTTGA 3810			

Figure 14–3. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX–DWV–VP1. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 97% (791/818) homology between nucleotide sequences of pBX–DWV–VP1 (GenBank accession No. KP739938.1) and 2993–3810 of JX878305.1.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2034 bits(1101)	0.0	1145/1167(98%)	0/1167(0%)	Plus/Plus
Query 3452	GGATCTGTTTGTGATCAAAATTGCTCAGTGGCCGACAAATTTGAGTGCACAGAGGTGAGCTA	3511		
Subject 10	GGATCTGTTTGTGATCAAAATTGCTCAGTGGCCGACAAATTTGAGTGCACAGAGGTGAGCTA	69		
Query 3512	GCTTTCTTACGAATTAGGGATGGAAAAGCAAGGTGCTGTAGGAACCTCAACCTTGGCGTACA	3571		
Subject 70	GCTTTCTTACGAATTAGGGACGGAAAAGCAAGGTGCTGTAGGAACCTCAACCTTGGCGTACA	129		
Query 3572	ATGGTTGTTTGGCCTTCTGGTCAATGGTTATAATATTGGCATACCTAAGTATAATGCTGAA	3631		
Subject 150	ATGGTTGTTTGGCCTTCTGGTCAATGGTTATAATATTGGCATACCTAAGTATAATGCTGAA	189		
Query 3632	CGAGCTGCCAGCTTGCACAAACACTTATATGGTGGCGGGTCAATTAAGTATGAGAAAGGCC	3691		
Subject 190	CGAGCTGCCAGCTTGCACAAACACTTATATGGTGGTGGGTCAATTAAGTATGAGAAAGGCC	249		
Query 3692	AAACAATTTATTTGTTCTGTGTAATCAACAAGGAACCTGGTAAGGTAAGCAATGGGAATCCA	3751		
Subject 250	AAACAATTTATTTGTTCTGTGTAATCAACAAGGAACCTGGTAAGGTAAGCAATGGGAATCCA	309		
Query 3752	GTATGGGAAGTTATGCGCGCGCATTTGGCAACACAGCGTGGCGCATGTTCAAGATTTTGAG	3811		
Subject 310	GTCTGGGAAGTCATGCGCGCACCATTTGGCAACACAGCGTGGCGCATGTTCAAGATTTTGAA	369		
Query 3812	TTTATTGAAGTATTCCAGAAAGGAGAGGAGTCTGTAATACTACAATCTTGGACAAGAAC	3871		
Subject 370	TTTATTGAAGTATTCCAGAAAGGAGAGGAGTCTGTAATACTACAATCTTGGATAAGAAC	429		
Query 3872	ACTACTTTACAGTCGAGCGGATTTGGTGGCGCATTTTGGGAAAGCTTTTAATGAOCTT	3931		
Subject 430	ACTACTTTACAGTCGAGCGGATTTGGTGGCGCATTTTGGGAAAGCTTTTAATGAOCTT	459		
Query 3932	AAAAAGTTAATGCGACGATATCAATTATATGGTCAATTTATTGTCOOGTTACTAAGGAT	3991		
Subject 490	AAAAAGTTAATGCGACGATATCAATTATATGGTCAATTTATTGTCOOGTTACTAAGGAT	549		
Query 3992	AAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTTGTTCACCAAGGGTTAGCGTTAGAC	4051		
Subject 550	AAGGATATTGATCATTGTATGTTTACCTTCCCTTGTTCACCAAGGGTTAGCGTTAGAC	609		
Query 4052	ATTGGTTGCTGGTGGCTCTCCACATGAAATCTTTAATAGATGTCGTGATGGCATTATACCA	4111		
Subject 610	ATTGGTTGAGTGGCTCCCGACATGAAATCTTTAATAGATGTCGTGATGGTATTATACCA	669		
Query 4112	TTAATTGGATGATGATATAGATTTTATAGAGGAGATTTGCGTTATAAGATTTGTTTTCCA	4171		
Subject 670	TTAATTGGATGATGATATAGATTTTATAGAGGAGATTTGCGTTATAAGATTTGTTTTCCA	729		
Query 4172	AGTAATGTTAACAGCAACATTTGGGTACAACATGACCGGATCGTAGATTGGAAGGATGG	4231		
Subject 730	AGTAATGTTAATAGCAACATTTGGGTACAACATGACCGGATCGTAGACTGGAAGGATGG	789		
Query 4232	TCTGGGGTAAAGATTGTAAATGCGATGCTGTCTACTGGTCAAGGGGTGTATAATCAT	4291		
Subject 790	TCTGGGGTAAAGATTGTAAATGCGATGCTGTCTACTGGTCAAGGGGTGTATAATCAT	849		
Query 4292	GGTTATGCTAGTCACATTCAAAATCAAGCGGTGAAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCA	4351		
Subject 850	GGTTATGCTAGTCACATTCAAAATCAAGCGGTGAAATAATGTTATAGAATTGGAAGTTCCA	909		
Query 4352	TTTTATAATGCTACTTGTATAAATATTTACAGGGGTTTAAATGGTCTAGGGCTGCATCT	4411		
Subject 910	TTTTATAATGCTACTTGTATAAATATTTACAGGGGTTTAAATGGTCTAGGGCTGCATCT	969		
Query 4412	AGTTATGCAATATCTTTAGGAGAAATATGGTTGGTTTTCAAGCTACAAGTATGATGATTT	4471		
Subject 970	AGTTATGCAATATCTTTAGGAGAAATATGGTTGGTTTTCAAGCTACAAGTATGATGATTT	1029		
Query 4472	GGATCTATTGTTAATAAACCTGTTACTATTATTATAGTATAGGAGATGGTATGCAATTT	4531		
Subject 1030	GGATCTATTGTTAATAAACCTGTTACTATTATTATAGTATAGGAGATGGTATGCAATTT	1089		
Query 4532	TCTCAGTGGGTTGGATATCAACCGATGATGATCCTAGAACAGCTTCTTGCACCAAGTAGTA	4591		
Subject 1090	TCTCAGTGGGTTGGATATCAACCGATGATGATCCTAGAACAGCTTCTTGCACCAAGTAGTA	1149		
Query 4592	AGGGCCGTGCTGAGGGCCCTATTGGG	4618		
Subject 1150	AGGGCCGTGCTGAGGGCCCTATTGGG	1176		

Figure 14-4. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX-DWV-VP1-VP3.

JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 98% (1145/1167) homology between nucleotide sequences of pBX-DWV-VP1-VP3 (GenBank accession No. KP751410.1) and 5420-4618 of JX878305.1.

Deformed wing virus strain Korea-2, complete genome
 Sequence ID: [gb|JX878305.1](#) Length: 10114 Number of Matches: 1

Range 1: 8756 to 9618		GenBank	Graphics	Next Match	Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1423 bits(770)	0.0	832/863(96%)	0/863(0%)	Plus/Plus	
Query	1	CAGTTAATGAGGAAAAAGGGAATAAAACCTCACACTATATTACGGATTGTTTGAAGAT	60		
Sbjct	8756				8815
Query	61	ACTTGTTCCTGTGGAAAAATGTAGAATACCTGGTAAGACTAGAATATTTAGTATAAGT	120		
Sbjct	8816				8875
Query	121	CCGGTACAGTTTACTATACCGTTTACAGAGTATTACTTAGATTTTATGGCATCCTATCGA	180		
Sbjct	8876				8935
Query	181	GCTGCACGACTTAATGCTGAGCATGGCATTGGTATTGATGTTAACAGCTTAGAGTGGACA	240		
Sbjct	8936				8995
Query	241	AATTTGGCAACAAGTTTGTCTAAGTATGGCACTCACATCGTGACAGGAGACTATAAGAAT	300		
Sbjct	8996				9055
Query	301	TTTGGTCTGGGTAGATTCTGATGTTGCGGCTTCAGCGTTTCAAATTTATTCGACTGG	360		
Sbjct	9056				9115
Query	361	GTGTTACATTACCCGAAGAAGATAATAAAGACGAAATGAAGCGAGTAATGTGGACCATG	420		
Sbjct	9116				9175
Query	421	GCGCAAGAGATCTTAGCGCTAGTCATCTGTGTGCGGATTTGGTGTACCGAGTACCTTGT	480		
Sbjct	9176				9235
Query	481	GGAAATCCATCAGGTTCTCCGATAACGGACATTTTGAATACAATTTCAAATTTGCTGCTA	540		
Sbjct	9236				9295
Query	541	ATTAGGTTAGCTTGGTTAGGTATTACTGATTTGCCGTTATCCGAGTTCTCTCAAATGTT	600		
Sbjct	9296				9355
Query	601	GTTCTTGTGTTTATGGTGATGATCTTATCATGAATGTTAGTGATAACATGATTGATAAAA	660		
Sbjct	9356				9415
Query	661	TTTAATGCTGTGACAAATAGGAAAAATCTTTTCACAATATAAGATGGAATTTACGGATCAG	720		
Sbjct	9416				9475
Query	721	GACAAATCAGGAAATACTGTGAAGTGGCGGACGTTACAGACTGCTACTTTCTTAAAGCAT	780		
Sbjct	9476				9535
Query	781	GGGTTTTTAAACATCCAACCTAGACCTGTGTTTCTGGCTAACCTAGACAAGGTTTCGGTG	840		
Sbjct	9536				9595
Query	841	GAAGGGACGACGAATGGACTCA	863		
Sbjct	9596				9618

Figure 14–5. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX–DWV–RdRP. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 96% (832/863) homology between nucleotide sequences of pBX–DWV–RdRP (GenBank accession No. KP739937.1) and 8756–9618 of JX878305.1.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1530 bits(828)	0.0	828/828(100%)	0/828(0%)	Plus/Plus
Query 7472	ACTAAGCCTCAGGGATCAACACAACAAGTAGACGCTGCTGTGAATAAAATTTACAGAAT			7531
Sbjct 1	ACTAAGCCTCAGGGATCAACACAACAAGTAGACGCTGCTGTGAATAAAATTTACAGAAT			60
Query 7532	ATGGTCTACATTGGTGTGTTTTCCCAAAAGTGCCGTGGTAGTAAGTGGCGAGATATTAAT			7591
Sbjct 61	ATGGTCTACATTGGTGTGTTTTCCCAAAAGTGCCGTGGTAGTAAGTGGCGAGATATTAAT			120
Query 7592	TTTCGGTGTCTTATGCTCCATAATAGGCAATGTTTGATGTTGAGGCATTATATTGAGTCA			7651
Sbjct 121	TTTCGGTGTCTTATGCTCCATAATAGGCAATGTTTGATGTTGAGGCATTATATTGAGTCA			180
Query 7652	ACTGCTGCCTTTCCCGAGGGAAACCAAGTACTATTTTAAAGTATATTCATAATCAAGAGACT			7711
Sbjct 181	ACTGCTGCCTTTCCCGAGGGAAACCAAGTACTATTTTAAAGTATATTCATAATCAAGAGACT			240
Query 7712	AGAATGTCGGTGTATTTCTGGTATTGAAATTGATTTGTTGAATTTACCTAGATTGTAT			7771
Sbjct 241	AGAATGTCGGTGTATTTCTGGTATTGAAATTGATTTGTTGAATTTACCTAGATTGTAT			300
Query 7772	TATGGTGGTCTCGCGGGAGAGGAGTCAATTTGATAGCAATATCGTGTGACTATGCCCT			7831
Sbjct 301	TATGGTGGTCTCGCGGGAGAGGAGTCAATTTGATAGCAATATCGTGTGACTATGCCCT			360
Query 7832	AATCGTATTCTGAGTGTAAAGACATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATG			7891
Sbjct 361	AATCGTATTCTGAGTGTAAAGACATTATTAATTTATAGCGTCACATAATGAACATATG			420
Query 7892	CGTGTCTCAGAAATGATGGAGTGTAGTAACTGGCGACCATACTCAGCTATTGGGTTTTGAG			7951
Sbjct 421	CGTGTCTCAGAAATGATGGAGTGTAGTAACTGGCGACCATACTCAGCTATTGGGTTTTGAG			480
Query 7952	AATAATAATAAACTCCAATAAGCATCAACGCTGATGGTTTGTATGAGGTTACTTCAA			8011
Sbjct 481	AATAATAATAAACTCCAATAAGCATCAACGCTGATGGTTTGTATGAGGTTACTTCAA			540
Query 8012	GGAGTATATACTTACCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTTGGTTCGATATTGTTGCTCGG			8071
Sbjct 541	GGAGTATATACTTACCCATACCATGGCGATGGTGTGTTGTTGGTTCGATATTGTTGCTCGG			600
Query 8072	AATTTGCAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTCCCTGAAGGATTGCATGGCTTT			8131
Sbjct 601	AATTTGCAACGGCCAATTATAGGTATCCATGTTGCTGGTCCCTGAAGGATTGCATGGCTTT			660
Query 8132	GGAGTTGCCGAACCACTTGTACATGAAATGTTCACTGGTAAAGCAATCGAGAGTGAAGA			8191
Sbjct 661	GGAGTTGCCGAACCACTTGTACATGAAATGTTCACTGGTAAAGCAATCGAGAGTGAAGA			720
Query 8192	GAGCCGTATGACCGTGTGTATGAACTCCCGTTCGCTGAATTAGATGAATCTGATATTGGT			8251
Sbjct 721	GAGCCGTATGACCGTGTGTATGAACTCCCGTTCGCTGAATTAGATGAATCTGATATTGGT			780
Query 8252	TTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAAAGTGGATGCAAAAGCTAGCT		8299	
Sbjct 781	TTAGATACCGATTTATATCCGATTGGTAAAGTGGATGCAAAAGCTAGCT		828	

Figure 14-6. DNA sequence homology between JX878305.1 and pBX-DWV-polyC3G. JX878305.1 is complete nucleotides of DWV deposited in GenBank. Alignment analysis was revealed 100% (828/828) homology between nucleotide sequences of pBX-DWV-polyC3G and 7472-8299 of JX878305.1.

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
577 bits(1487)	0.0	Compositional matrix adjust.	273/273(100%)	273/273(100%)	0/273(0%)
Query 622	L I V G V Y P G L T A S L Q Q Q M D Y M K L K S S S Y V F D L Q E S N S F T F E V P Y V S Y R P W W V R K Y G G N Y L			681	
Sbjct 1	L I V G V Y P G L T A S L Q Q Q M D Y M K L K S S S Y V F D L Q E S N S F T F E V P Y V S Y R P W W V R K Y G G N Y L			60	
Query 682	P S S T D A P S T L F M Y V Q V P L I P M E A V S D T I D I N V Y V R G G S S F E V C V P V Q P S L G L M N T D F I L			741	
Sbjct 61	P S S T D A P S T L F M Y V Q V P L I P M E A V S D T I D I N V Y V R G G S S F E V C V P V Q P S L G L M N T D F I L			120	
Query 742	R N D E E Y R A K T G Y A P Y Y A G V W H S F N S N S L V F R W G S A S D Q I A Q W P T I S V P R G E L A F L R I R D			801	
Sbjct 121	R N D E E Y R A K T G Y A P Y Y A G V W H S F N S N S L V F R W G S A S D Q I A Q W P T I S V P R G E L A F L R I R D			180	
Query 802	G K Q A A V G T Q P W R T M V W P S G H G Y N I G I P T Y N A E R A R Q L A Q H L Y G G G S L T D E K A K Q L F V P A			861	
Sbjct 181	G K Q A A V G T Q P W R T M V W P S G H G Y N I G I P T Y N A E R A R Q L A Q H L Y G G G S L T D E K A K Q L F V P A			240	
Query 862	N Q Q G P G K V S N G N P V W E V M R A P L A T O R A H V Q D F E		894		
Sbjct 241	N Q Q G P G K V S N G N P V W E V M R A P L A T O R A H V Q D F E		273		

Figure 14-7. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX-DWV-VP1.

The deduced amino acid sequences based on pBX-DWV-VP1 (GenBank accession No. KP739938.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 2993-3810 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 100% (273/273).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
816 bits(2108)	0.0	Compositional matrix adjust.	388/389(99%)	388/389(99%)	0/389(0%)
Query 775	G S A S D Q I A Q W P T I S V P R G E L A F L R I R D G K Q A A V G T Q P W R T M V W P S G H G Y N I G I P T Y N A E			834	
Sbjct 4	G S A S D Q I A Q W P T I S V P R G E L A F L R I R D G K Q A A V G T Q P W R T M V W P S G H G Y N I G I P T Y N A E			63	
Query 835	R A R Q L A Q H L Y G G G S L T D E K A K Q L F V P A N Q Q G P G K V S N G N P V W E V M R A P L A T O R A H V Q D F E			894	
Sbjct 64	R A R Q L A Q H L Y G G G S L T D E K A K Q L F V P A N Q Q G P G K V S N G N P V W E V M R A P L A T O R A H V Q D F E			123	
Query 895	F I E A I P E G E E S R N T T I L D T T T T L Q S S G F G R A F F G E A F N D L K T L M R R Y Q L Y G Q L L L S Y T T D			954	
Sbjct 124	F I E A I P E G E E S R N T T I L D T T T T L Q S S G F G R A F F G E A F N D L K T L M R R Y Q L Y G Q L L L S Y T T D			183	
Query 955	K D I D H C M F T F P C L P Q G L A L D I G S A G S P H E I F N R I C R D G I I P L I A S G Y R F Y R G D L R Y K I V F P			1014	
Sbjct 184	K D I D H C M F T F P C L P Q G L A L D I G S A G S P H E I F N R I C R D G I I P L I A S G Y R F Y R G D L R Y K I V F P			243	
Query 1015	S N V N S N I W Q H R P D R R L E G W S A A K I V N C D A V S T G G G W N H G Y A S H I Q I T R V N N V I E L E V P			1074	
Sbjct 244	S N V N S N I W Q H R P D R R L E G W S A A K I V N C D A V S T G G G W N H G Y A S H I Q I T R V N N V I E L E V P			303	
Query 1075	F Y N A T C Y N Y L Q A F N A S S A A S S Y A V S L G E I S V G F Q A T S D D I A S I V N K P V T I Y Y S I G D G M Q F			1134	
Sbjct 304	F Y N A T C Y N Y L Q A F N A S S A A S S Y A V S L G E I S V G F Q A T S D D I A S I V N K P V T I Y Y S I G D G M Q F			363	
Query 1135	S Q I W G Y O P M I I L D Q L P A P Y V R A V P E G P I A		1163		
Sbjct 364	S Q I W G Y O P M I I L D Q L P A P Y V R A V P E G P I A		392		

Figure 14-8. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX-DWV-VP1-VP3. The deduced amino acid sequences based on pBX-DWV-VP1-VP3 (GenBank accession No. KP751410.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 5420-4618 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (388/389).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
603 bits(1554)	0.0	Compositional matrix adjust.	286/287(99%)	287/287(100%)	0/287(0%)
Query 2543	QLMRKKGIKPHTIFTDCLKDOTCLPVEKCRIPGKTRIFSPVQFTIPFRQVYLDFMASVR			2602	
Sbjct 1	QLMRKKGIKPHTIFTDCLKDOTCLPVEKCRIPGKTRIFSPVQFTIPFRQVYLDFMASVR			60	
Query 2603	AARLNAEHGIGIDVNSLEWITNLTSLSKYV8THIVTGDVKNFPGPLDSDVAASAFKIIIDW			2662	
Sbjct 61	AARLNAEHGIGIDVNSLEWITNLTSLSKYV8THIVTGDVKNFPGPLDSDVAASAFKIIIDW			120	
Query 2663	VLHYTEEDNKDEMKRVMWTTMADEILAPSHLCRDLVYRVPFCGIPSGSPIIDILNTISNCLL			2722	
Sbjct 121	VLHYTEEDNKDEMKRVMWTTMADEILAPSHLCRDLVYRVPFCGIPSGSPIIDILNTISNCLL			180	
Query 2723	IRLAWLGIITDLPSEFSQNVVLCVGGDILMNVSDNMIKDFNAVITGKFFSQVKMEFTDQ			2782	
Sbjct 181	IRLAWLGIITDLPSEFSQNVVLCVGGDILMNVSDNMIKDFNAVITGKFFSQVKMEFTDQ			240	
Query 2783	DKSGNTVKWRITLQATFLKHGFLKHPTRPVFLANLKDVSVEGTTNWT		2829		
Sbjct 241	DKSGNTVKWRITLQATFLKHGFLKHPTRPVFLANLKDVSVEGTTNWT		287		

Figure 14–9. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX–DWV–RdRP clone. The deduced amino acid sequences based on pBX–DWV–RdRP (GenBank accession No. KP739937.1) was aligned with the deduced amino acid sequences on 8756–9618 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (286/287).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
574 bits(1479)	0.0	Compositional matrix adjust.	273/276(99%)	274/276(99%)	0/276(0%)
Query 2115	TKPQGSTQQVDAAVNKILQNMVYIGVVFPKVPGSKWFDINFRCLMLHNRQCLMLRHYIES			2174	
Sbjct 1	TKPQGSTQQVDAAVNKILQNMVYIGVVFPKVPGS+WIDINFRCLMLHNRQCLMLRHYIES			60	
Query 2175	TAAFPEGTKYVFKYIHNDQTRMSGDISGIEIDLLNLPRLYYGGLAGEESFDSNIVLYTMP			2234	
Sbjct 61	TAAFPEGTKYVFKYIHNDQTRMSGDISGIEIDLLNLPRLYYGGLAGEESFDSNIVLYTMP			120	
Query 2235	NRIPPECKSIKFIASHNEHMRAQNDIGVLTGDHTQLLGFENNNKTPISINADGLYEVILQ			2294	
Sbjct 121	NRIPPECKSIKFIASHNEHMRAQNDIGVLTGDHTQLLGFENNNKTPISINADGLYEVILQ			180	
Query 2295	GVYTPYVHGDGVCGSILLSRNLQRPVIGIHVAGPEGLHGFVVAEPLVHEMFTGKAIESER			2354	
Sbjct 181	GVYTPYVHGDGVCGSILLSRNLQRPVIGIHVAGPEGLHGFVVAEPLVHEMFTGKAIESER			240	
Query 2355	EPYDRVYELPLRELDSDIGLDTDLYPIGKVDAKLA		2390		
Sbjct 241	EPYDRVYELPLRELDSDIGLDTDLYPIGKVDAKLA		276		

Figure 14–10. Amino acid sequence homology between JX878305.1 and pBX–DWV–polyC3G clone. The deduced amino acid sequences based on pBX–DWV–polyC3G was aligned with the deduced amino acid sequences on 7472–8299 of JX878305.1 The homology between both amino acid sequences was calculated as 99% (273/276).

나. DWV 재조합 단백질들의 발현 확인

재조합 DNA의 염기서열들과 DWV의 각 유전자간 상동성 여부를 확인 한 후, 4개 유전자들을 각기 발현 vector system인 pET32a(+) 및 pMAL-C2에 subcloning을 하여 각 재조합 단백질들을 대장균 내에서 과발현시키하고자 하였다. 과발현이 확인된 재조합체는 5종이었으며, 이들은 각기 DNA 재조합 프로그램(pDRAW32)을 사용하여 예측한 재조합 단백질의 예상 크기인 pMAL-DWV-VP1, 75kDa; pMAL-DWV-VP1-VP3, 93kDa; pMAL-DWV-polyC3G, 81kDa; pMAL-DWV-RdRP, 81kDa; pET32a-DWV-polyC3G, 50kDa에 근접한 과발현 단백질 밴드를 보여주었다(Fig. 14-11)

발현유도를 위한 최적 IPTG농도들은 모든 발현계에서 0.1-0.3mM에 나타났으며, 본 연구에서 사용한 유전자들(DWV-VP1, -VP1-VP3, RdRP, C3G)은 거의 모든 경우에서 pMAL vector에 의한 MBP와 융합단백질을 이루어 과발현됨을 보여 주었다. 한편, pET vector에 의하여 C3G의 발현이 확인되었을 뿐 나머지 재조합체에 의한 과발현은 발견되지 않았다(Fig. 14-11. E).

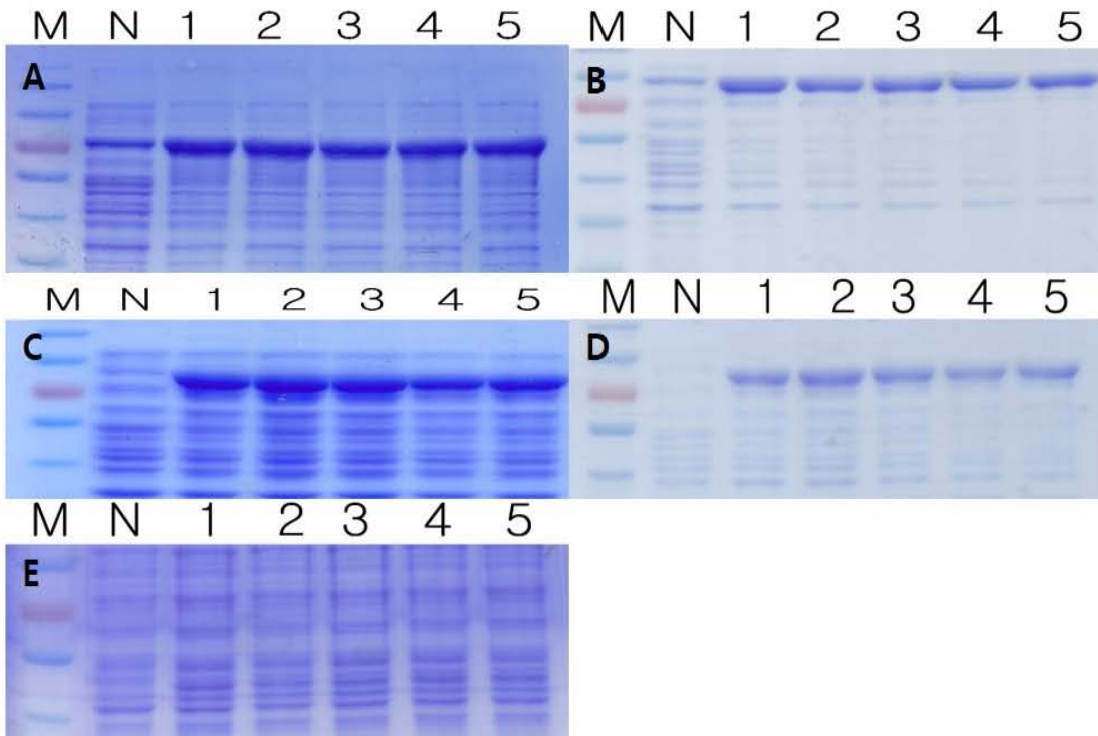


Figure 14-11. Expression of DWV proteins depends on IPTG concentration. All recombinant DNA in *E. coli* BL21 was cultured until OD600 reach to 0.6 and induced by

IPTG to express recombinant DWV proteins. Bacterial cell was collected at 6 hours after induction, respectively. Panel A. pMAL-DWV VP1, Panel B. pMAL-DWV-VP1-VP3, Panel C. pMAL-DWV-RdRp, Panel D. pMAL-DWV-polyC3G, and Panel E. pET32a-DWV-polyC3G. Lane M was protein size marker(T&I). Lane N were cultures without IPTG-induction. Lanes 1 to 5 were induced culture with 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 and 2 mM of IPTG, final concentration, respectively.

다. DWV 단백질의 정제

pET32a-DWV-polyC3G은 Ni^+ column을 사용하여 정제를 진행하였으며, pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-RdRP pMAL-DWV-polyC3G의 경우에는 MBP column을 사용하여 재조합 단백질들을 각기 순수분리하였다. 재조합 단백질의 순수분리 후 정제된 단백질은 12% SDS-PAGE를 사용하여 결과를 재확인하였다(Fig 14-12).

이후 Bradford assay를 통하여 각 정제된 단백질들을 정량하였으며, 그 결과 pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3, pMAL-DWV-polyC3G, pMAL-DWV-RdRP, pET32a-DWV-polyC3G의 단백질량은 각각 2.71mg/ml (total 8.13mg of recombinant protein /125ml culture), 4.71mg/ml (total 14.13mg of recombinant protein/125ml culture), 2.07mg/ml (total 6.21mg of recombinant protein/125ml culture), 2.57mg/ml (total 7.71mg of recombinant protein/125ml culture), 1.04mg/ml (total 3.12mg of recombinant protein/125ml culture)로 나타났다.

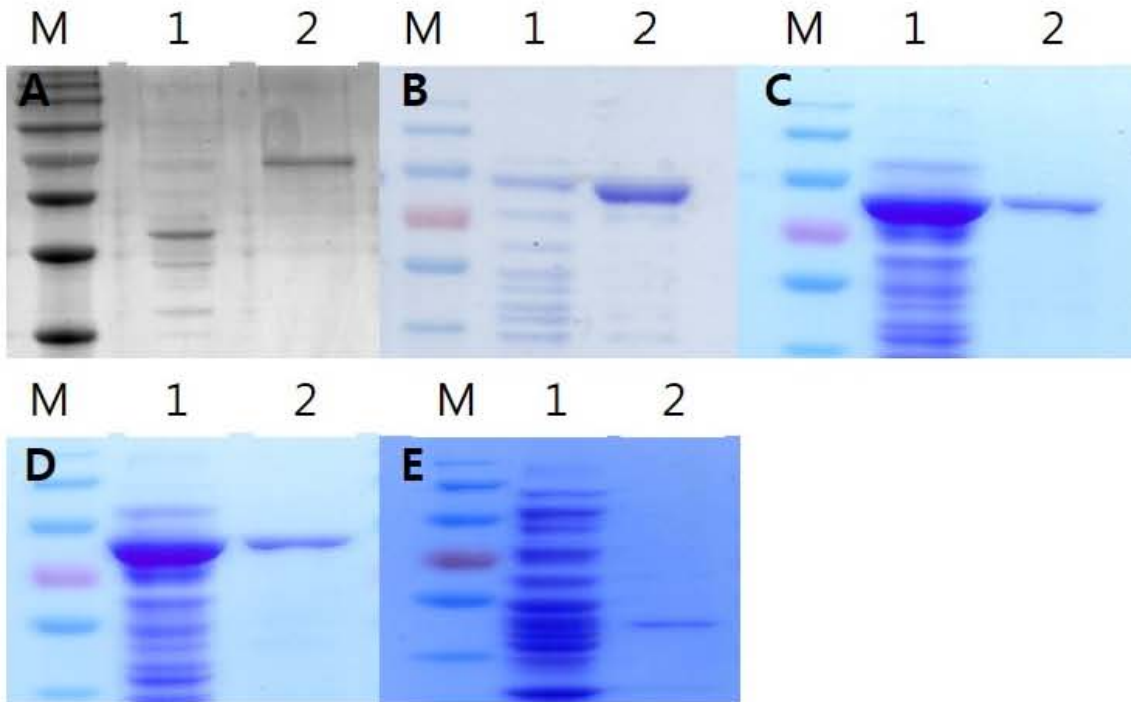


Figure 14-12. The purifications of recombinant DWV proteins

Panel A. pMAL-DWV VP1, Panel B. pMAL-DWV-VP1-VP3, Panel C. pMAL-DWV-RdRp, Panel D. pMAL-DWV-polyC3G, Panel E. pET32a-DWV-polyC3G. Lane M in each panel was protein size marker(T&I). Lane 1 of each panel were total proteins from each culture induced IPTG, lane 2 of each panel were affinity-column-purified recombinant proteins from each culture.

DWV (Deformed Wing Virus)는 날개불구병이라는 이름으로 국내에도 널리 알려진 바이러스이며, 2013년 꿀벌질병관리센터(Center for Honeybee disease control)의 조사에 의하면 국내 꿀벌의 바이러스 질병 중 3번째로 많이 발견되는 바이러스이다(Yoo et al., 2014).

국내의 꿀벌 질병 중 DWV를 포함한 꿀벌 바이러스에 관한 연구는, 병원체의 분자적 검출에 크게 집중되어 있고, 그것도 실험실적 유전자 진단에 초점이 맞추어져 있다고 판단된다. 바이러스 질병을 보다 근본적으로 극복하기 위하여 바이러스에 관한 연구, 즉 바이러스의 특정 단백질들의 특성연구 또는 바이러스의 감염 및 전파에서 바이러스의 각 단백질들의 기능 등에 대한 연구는 불가결할 것이라 생각되나, 국내에서는 이러한 연구들이 미진하다.

본 연구는 DWV의 각 개별 단백질에 대한 연구를 위하여, 대표적 구조단백질인 VP1, VP3와 대표적 비구조단백질이며, 바이러스의 생존에 불가결한 RdRP, C3G를 재조합 DNA방법을 통한

재조합 단백질들로 생산하고자 하였으며, 이는 바로 개별 단백질의 연구를 위하여 연구재료를 생산하고자하는 것이었다.

본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 RdRP (RNA dependent RNA polymerase)는 DWV 유전체를 복제하는 기능의 중요 단백질 효소이나, 이 단백질의 기능에 대한 납득할 만한 가설, 즉 어떻게, 어디서부터, positive-RNA(유전체)를 주형으로 negative RNA(복제형)를 만들고, 또한 negative RNA(복제형)로부터 positive RNA(유전체)를 대량 생산할 수 있는가는 성립되지도 않고 있다.

근래 RdRP는 식물체에서도 발견되어, 식물체의 바이러스 침입 등에 대한 방어 작용인 RNA 간섭(interference; RNAi) 현상에 관여하는 것으로 관심을 모으고 있으며, 국내에 큰 영향을 미친 바 있는 구제역 바이러스 (FMDV; Foot-and-Mouth Disease Virus)와 메르스를 유발하는 코로나 바이러스 (MERS-CoV; Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) 등도 동일 기능의 RdRP유전자를 가지고 있어, 이 기능에 의하여 바이러스의 자체 복제가 진행된다. 이런 바이러스의 생존에 불가결한 효소들은 항 바이러스제 발굴을 위한 효소저해제 개발에 매우 좋은 대상이 된다. 따라서 본 연구에서 개발된 DWV-RdRP의 생산법은 이 효소를 이용한 저해제 발굴 및 항바이러스제의 개발과 인체에 무해한 꿀벌바이러스에서 유래한 이 RdRP 단백질은 바이러스 연구에 있어서 많은 장점을 보여줄 것으로 기대한다.

또한, 본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 C3G (C3G peptidase)는 polyprotein의 형태로 1차 생산된 DWV의 단백질을 개별 단백질들로 절단, 분리, 활성화시키는 단백질 절단효소이다. 이 역시 DWV의 생존에 불가결한 기능을 수행하여야 하며, 그 절단부위 및 특성에 관한 연구는 새로운 항바이러스제 개발을 위한 신약개발과정에서 시급히 요구된다.

한편, 본 연구를 통하여 재조합 단백질로 생산된 구조단백질 VP1 및 VP3은 바이러스의 외피를 구성하는 주요 단백질들로, 고등동물의 방어기작인 항원/항체반응에서, 일반적으로 우수한 항원결정기(epitope)로 기능한다. 현재의 꿀벌바이러스의 연구에서 꿀벌 바이러스의 보다 쉬운 현장 검사를 위한 immunochromatography법의 개발은 매우 시급히 요구되는 것이며, 이를 위한 우수한 항원과 항체의 개발은 선결과제라 판단된다. 본 연구에서 개발된 구조단백질 VP1 및 VP3의 대량생산법은 이런 기대에 부응하는 것이라 판단되며, 이들을 이용한 특이항체의 개발이 바로 이어지기를 기대한다.

제 15 절 특이 단일클론항체를 이용한 Sacbrood Virus의 검출

1. 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 연구의 결과는 Bionote사의 Rapid test kit의 개발에 적용되었으며, 이 연구결과는 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.

2. 요약 결과

가. 재조합 SBV-Capsid protein의 발현 및 정제

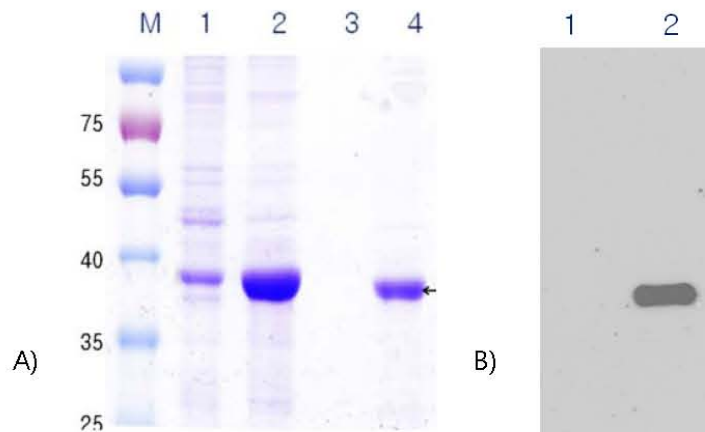


Fig. 15-1. Recombinant VP-SBV 단백질의 과발현 및 His-tag정제된 단백질들의 SDS-PAGE

대장균 숙주 Rosetta(DE3)pLysS에서 발현시킨 pET32a+VP-SBV 를 IPTG induction으로 과 발현시켰다. Panel A는 12% SDS -PAGE로 rVP-SBV를 발현한 E.coli Rosetta(DE3)pLysS 의 total protein profile을 보여주며, Panel B는 anti-His-Tag antibody를 사용한 Western blot 의 결과이다. M은 protein ladder marker (T&TM ACCU-eco Pre-stained Marker, Korea); 1은 total cell lysate from noninduced E.coli; 2는 total cell lysate from induced E.coli; 3은 His-tag purified total E.coli protein; 4는 His-tag purified rVP-SBV fusion protein. Black arrow 는 37 kDa의 rVP-SBV fusion protein이다.

나. SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 선발

Table 15-1: ELISA, dot-blot, Western blot에 사용된 anti-recombinant, anti-native VP-SBV의 monoclonal antibodies (MAbs)

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	

다. SBV-Capsid 단일클론항체들의 항원 특이도

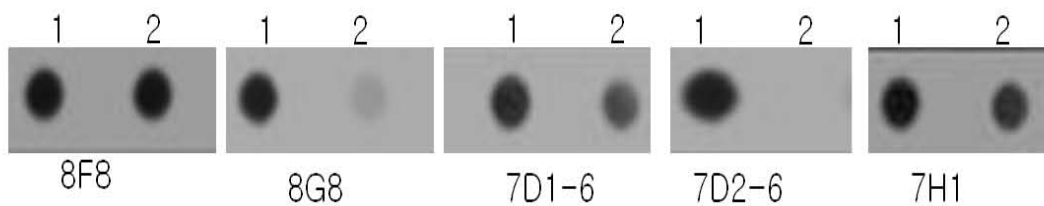


Fig. 15-2. Dot blot를 이용한 MAbs들의 specificity분석

1은 Rosetta E.coli containing rVP-SBV의 Lysates이며, 2는 SBV에 감염된 honeybees의 homogenates이다. 이들은 각기 2 μ l/spot로 점적되었으며, 각기 8F8, 8G8, 7D1-6, 7D2-6, 7H1. 단클론항체와 반응시켰다.

라. Native 항원에 대한 SBV-Capsid 단일클론항체의 항원 특이도

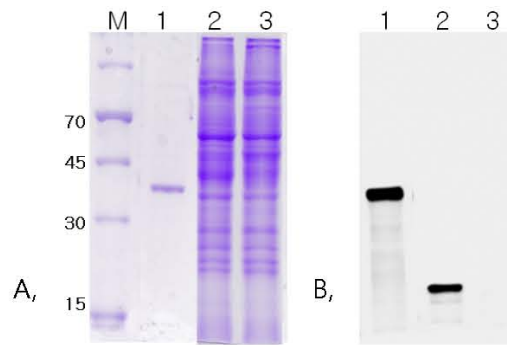


Fig. 15-3. 꿀벌 homogenate의 native SBV major capsid protein과 rVP1-SBV에 대한 8F8 MAb의 western blot

Panel A는 12 % SDS-PAGE을 coomassie brilliant blue로 염색한 것이며, panel B는 이를 PVDF membrane으로 옮겨, MAb 8F8로 western blotting한 것이다. M은 protein ladder marker (Fermentas, Germany); 1은 purified rVP-SBV; 2는 tissues homogenate from honeybee infected SBV; 3은 homogenate from honeybee noninfected SBV임.

마. 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체의 교차반응성

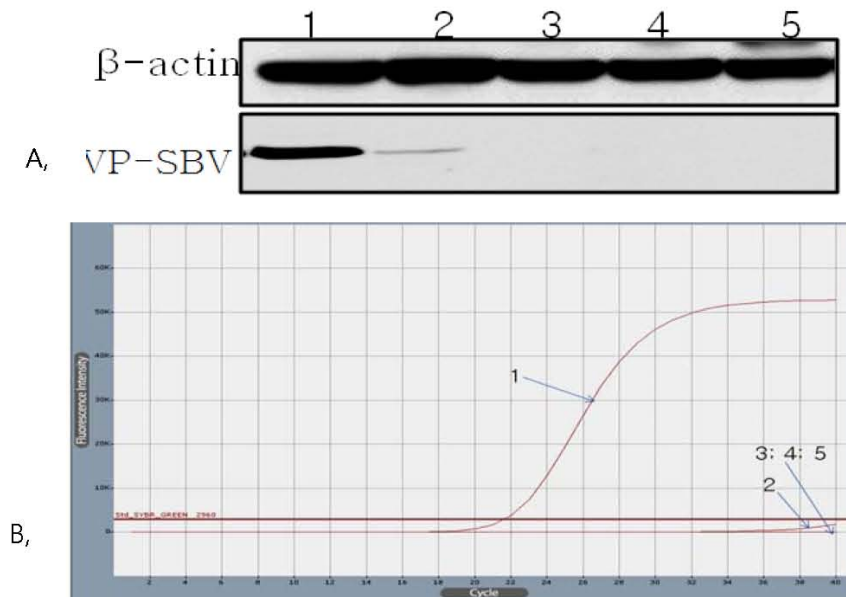


Fig.15-4. MAbs들의 Cross-reactivity.

Deformed Wings virus (DWV), Korea Sacbrood virus (KSBV), Black Queen cell virus (BQCV), Israeli acute paralysis virus (IAPV)에 감염된 꿀벌의 과쇄액을 사용하여 단클론항체의 non-specific recognition을 검사하였다. 1=SBV; 2=KSBV; 3=DWV; 4=IAPV; 5=BQCV.

바. 선발된 SBV-Capsid 단일클론항체들의 민감도

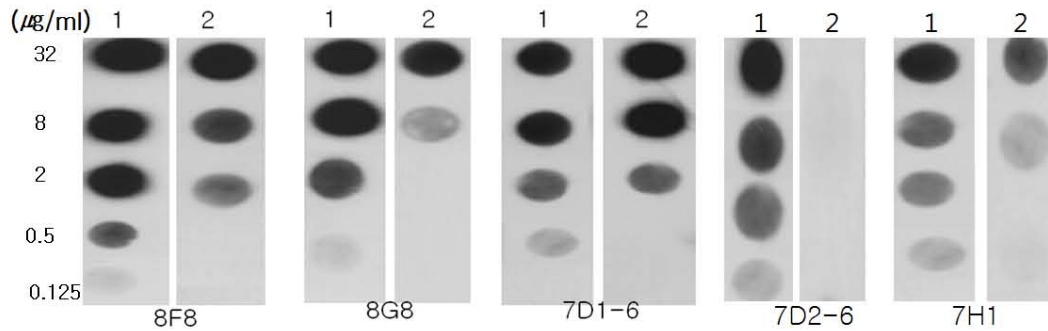


Fig. 15-5. 단클론 항체의 VP-SBV에 대한 sensitivity 검사

1은 lysate of Rosetta E.coli containing VP-SBV; 2는 honeybee homogenate from bees infected by SBV임. 이들을 각기 항원으로 사용하여, 각기 희석하여 점적하였으며, 다양한 항체들의 민감도를 측정하였다.

사. 감염시료에 대한 SBV-Capsid 특이 단일클론항체의 적용

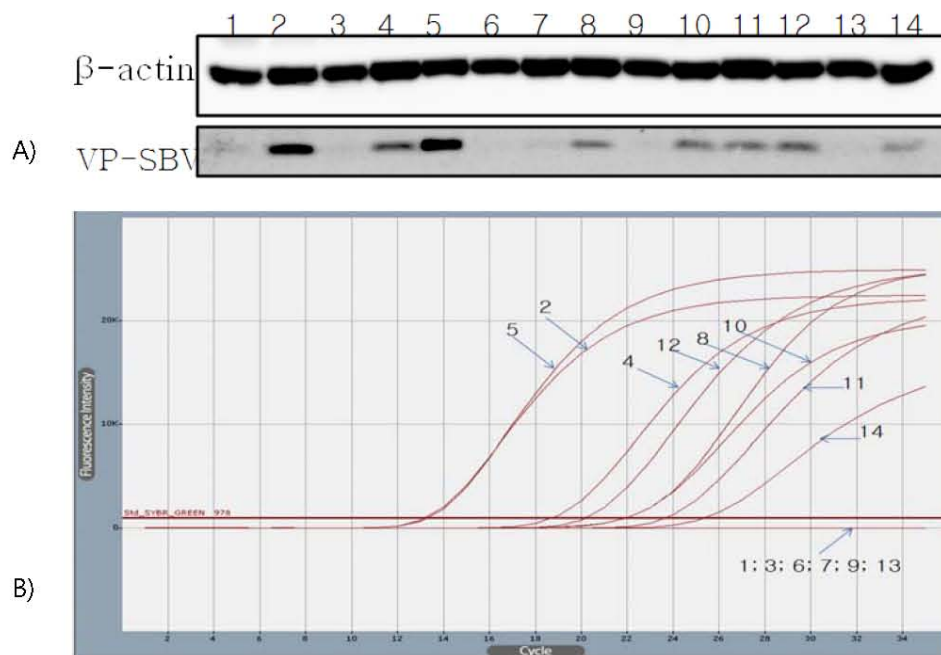


Fig. 15-6. 재조합 8F8 MAb사용한 SBV감염 꿀벌 시료들의 검사.

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

제 16 절 면역분석법에 의한 꿀벌 질병 예방 및 치료제의 효능 검증기술

1. 면역분석법에 의한 AFB 예방치료제 효능검증법 개발

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 초기배양에서 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).

미국부저병에 대한 예방 및 치료제의 검정을 위해서는 실험실내의 정확하고 신속한 정량적 진단방법이 요구된다. 실험실적으로 대량 시료를 빠르게 처리해야 할 경우나 현장에서 별도의 기기 없이 신속한 진단을 위해서는 ELISA나 Immunochromatographic assay (ICA)의 적용은 이상적이라 할 수 있다.

따라서 본 연구의 목적은 AFB 발생여부, 나아가 원인균주의 감염 경증을 검사하기 위하여 유충내의 *P. larvae* 정량을 위한 ELISA를 개발하여 AFB의 예방 및 치료제의 효능검증에 적용하고자 한 것이다. 이를 위하여 기본적으로 *P. larvae*에 특이적인 마우스 단클론항체를 개발하였고, 이를 ELISA의 Detector 및 Capture로 사용하였다.

가. *P. larvae*에 대한 단클론항체 제작

면역원으로서는 *P. larvae flagella* 항원을 사용하였다. *P. larvae*는 flagella를 갖는 세균이므로 세균의 detection에 이상적인 항원이 될 수 있다. Flagella 항원의 정제를 위하여 *P. larvae*를 BHI 배지에서 24시간 동안 배양하여 그람염색을 통하여 그람양성의 간균임을 확인하고 수확하였다.

*P. larvae*의 flagella를 분리하기 위하여 배양된 *P. larvae*를 수확하여 glass bead를 사용하여 flagella를 절단한 후, 원심분리를 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. 이 후 원심분리(5,000 x g, 20min)를 통하여 절단된 flagella가 부유된 상층액을 회수하고, 이들 상층액을 pool하여 최종적인 원심분리 (14,000 x g, 40min)를 통하여 침전된 flagella 분획을 얻어내었다.

최종적으로 얻어진 분획은 높은 항원가를 보이는 순수한 flagella의 분획으로 판단되었으며 단백질농도는 약 300 μ g/ml 이었다. Flagella의 분획은 소분하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하며 마우스의 면역과 Hybridoma의 screening에 사용하였다.

각각 준비한 *P. larvae* flagella 항원을 동량의 Complete Freund's Adjuvant (Sigma, U.S.A.)에 유제화하여 6주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내 접종하여 면역을 실시하였다. 추가접종은 50 μ l의 항원액과 Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, U.S.A.)을 동량으로 섞은 유제액을 2주 간격으로 3회 복강내로 접종하였으며, 매 추가접종시 미정맥을 이용한 소량의 체혈을 통하여 항체가를 측정하였다. 만족할 만한 역가를 확인 한 후 항원액 만을 24시간 간격으로 50 μ l씩 3회 복강내로 접종하였다.

면역횟수의 증가에 따라, 항체가의 상승이 관찰되었으며, 본 연구실에서는, 항체가가 적어도 10⁵ 이상을 보이는 시점에서 SP/2, myeloma와의 fusion을 통하여 특이항체를 분비하는 hybridoma 클론들을 생산하는 것을 표준으로 하였다.

표 16-1. 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

Myeloma cell과 spleen cell의 융합은 본 연구실의 표준시험법에 준하여 실시하였다. 즉, 최종 면역접종 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 $^{\circ}$ 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). 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.

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 peroxidase (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 2.0이상인 clone들은 따로 선별하여, 일부는 우선적으로 동결시켜 보관하며, 제한희석법 (0.5 cell/well) 으로 특이항체를 분비하는 clone을 선별하였다. 선별된 hybridoma는 추가적인 배양을 실시한 후 복수 생산에 사용하였다.

고역가를 보이는 hybridoma 클론들을 수차례 계대하며 특정한 항체분비능을 유지하는 클론을 선택하였다. 개발된 Clone은 10⁶ 이상을 역가를 보이는 PC01 및 2G6, 3D2, 5G9 등이며, 이들을 통하여 복수를 생산하였다.

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 감작시켜 놓았다. 이후 약 10일간 복수형성 상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 -20 $^{\circ}$ C냉동보관하며 MAb 정제에 사용하였다.

특이 단클론항체가 함유된 복수의 정제는 Protein G sepharose 4B gel (Pharmacia LKB,

Sweden)을 이용하여 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 (0.22 μ m pore size) 다음, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

나. ELISA system

ELISA kit의 실험조건을 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.

HRP-MAb conjugates는 Wilson과 Nakane (1978)의 방법에 의해 제조하였다. 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.

단클론항체가 흡착된 plate 준비를 위하여, 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 봉쇄(blocking)하였다. antibody pair 결정을 위하여 준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 균체부유액을 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 (대조과장 492nm)에서 흡광도를 측정하여, 각 단클론항체의 조합중 발색반응이 가장 우수한 pair를 흡착용 항체 및 접합체 제조용 항체로 선정하였다.

Sandwich ELISA를 위한 capture항체와 detector항체의 조건을 알아보기 위하여, 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 사체에 spike test를 실시하였다. 즉, 균체를 가

한 유충을 microcentrifuge tube에 넣고 200 μ l의 PBS-T를 가한 후, microcentrifuge tube용 plastic 봉(disposable plastic pestles, conical, 70mm, Biobasic inc.)으로 마쇄하고 20초간 원심 분리하였다 (3,000 rpm). 원심상층액은 따로 회수하여 ELISA를 실시하였다.

다. ELISA의 검출감도

미국부지병의 실험실적 검사를 위하여 개발한 ELISA의 검출한계는 vegetative cell의 경우 10⁵cell/ml까지 검출가능하였으며, 100 μ l의 시료량으로 계산한다면 10⁴ cell까지 검출가능하였다.

라. ICG system

현장진단용 면역분석법으로서 ICG는 매우 유용한 방법이며, 이를 위하여 개발된 4종의 MAb clone을 적용하였다. 감염된 유충에서의 병원균의 형태는 vegetative form 이므로 균의 flagella에 대한 특이항체를 적용하였다. 특이하게도, flagella에 대한 단일클론항체 4종 모두 anti-IgM과 특이적인 반응을 보였으며, protein G-HRP와도 반응을 보이지 않았다.

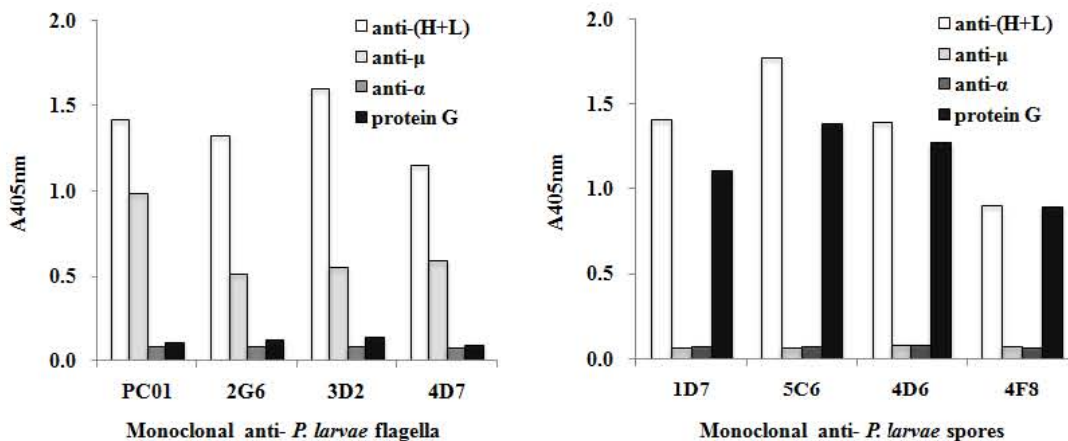


그림 16-1. Immunoglobulin type of 4 monoclonal anti-*P. larvae* flagella (PC01, 2G6, 3D2, 4D7) and 4 monoclonal anti-*P. larvae* spore (1D7, 5C6, 4D6, 4F8).

Each ascitis of 8 hybridomas were diluted 1,000 fold and reacted with *P. larvae* flagella and *P. larvae* spore-coated ELISA plates. Bound antibodies were detected by HRP labeled goat anti-Mouse IgG (H+L), goat anti-mouse IgM (μ -chain), goat anti-mouse IgA (α -chain) and protein G.

Protein G는 Streptococcus에서 분리된 IgG Fc 수용체 단백질이며(Schröder *et al.*, 1986), goat anti-Mouse IgG (H+L)는 IgG뿐 아니라 IgM 및 IgA와도 교차반응이 가능함을 고려해 볼 때,

P. larvae flagella에 대한 단일클론항체는 모두 IgM type인 것으로 판단된다.

P. larvae flagella 항원의 경우, 단클론항체를 제조하기 위한 일반적인 고도면역방법을 적용했음에도 불구하고 IgM에서 IgG로의 immunoglobulin class switching이 유도되지 않았으며, B cell 항원 수용체에 특이적인 T cell의 역할에 (Lange *et al.*, 2012) 미치는 flagella 항원의 특징적인 면역반응이 작용하는 것으로서, 이에 대해서는 추가적인 고찰이 필요하다.

마. 시제품의 민감도 조사

현장검사법의 제품화를 위하여 바이오노트 사에 제작 의뢰한 AFB immunochromatography detection kit의 실험 결과는 다음과 같았다.

즉, AFB의 원인균 *Paenibacillus larvae* ATCC9545의 배양 중, 배양시간에 따른 각 CFU의 수를 측정하였고, 동시에 각 배양액을 사용하여 바이오노트사 제작, AFB immunochromatography detection kit 의 detection limit를 파악하였다. CFU의 계산은, 배양시간에 따른 각 배양액을 계단희석하여, 이를 고체 배지에 도말하고, 각 plate의 성장된 *P. larvae* 집락수를 계수하여, 각 immunochromatography detection에 사용하였던, 그 당시 그 배양액의 CFU값을 계산하였다.

ICG test의 loading은 배양액 30 ul + buffer 60 ul = 90 ul 씩이었으며, 뒤의 Figure에 나타난 CFU수는 배양액 30 ul의 cfu를 표현한 것이다. 매 배양액마다 5 개의 detection kit를 사용하여 각각의 양상이 동일하게 나타나는지 확인하였다. 결과는 3.1×10^5 CFU/ 30ul의 수준부터 양성반응을 보였다. 이정도의 균수라면 larvae가 감염된 초기의 수준에서 감염의 검출이 가능할 것으로 사료되었다.

표 16-2. 2G6 clone을 적용한 AFB 현장적용검출 kit 의 시제품

배양시간	Kit의 Test line 형태	측정한 CFU 값 (1kit 당 loading 되는 30 ul의 CFU)
5hours 30min		$1.05 \times 10^1 / 30ul$
7hours 30min		$3.5 \times 10^2 / 30ul$
20hours 30min		$3.1 \times 10^5 / 30ul^*$
26hours 30min		$3.1 \times 10^5 / 30ul^*$
49hours		$1.4 \times 10^6 / 30ul$
54hours		$1.0 \times 10^6 / 30ul^{**}$
120hours		현재 미확인 (self-lysis추정)

2. 면역분석법에 의한 EFB 예방치료제 효능검증법

Deep freezer(-80℃)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 20장의 KS-BHA 배지에 도말 접종하여 마련하였다. PackAnaero(MGC, Inc)를 이용하여 혐기 상태로 37℃에서 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℃에 보관하였다.

표 16-3. Composition of *Melisococcus plutonius* culture medium per liter

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

가. *Melisococcus plutonius*에 대한 단클론항체 제작

Formaldehyde로 처리한 사균화 항원을 BALB/c 마우스에 면역시켰다. 즉, 냉동보관된 균액을 최종농도 0.2% glutaraldehyde를 첨가하여 OD를 0.1로 조정 한 후 30분간 방치한 다음 원심분리하여 상층액은 버리고 0.2% glutaraldehyde 와 3.6% (wt/vol) formaldehyde가 첨가된 50mM phosphate buffer (pH7.5)용액을 첨가하여 1시간동안 고정하였다. 이 균액 0.4 ml을 마우스 면역에 사용하였다.

면역을 위한 항원은 침전용적 대비 2배 용적의 생리식염수에 부유시킨 후 마우스 한 마리당 균체항원 및 아포항원 50ul를 동량의 Complete Freund Adjuvant에 유제화하여 6주령의 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.

세포융합은 본 연구실의 표준실험법에 준하여 실시하였다. 즉, 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℃로 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. 특히 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 peroxidase (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 일부 동결시켜 보관하며, 제한 희석법 (0.5 cell/well) 으로 특이항체를 분비하는 clone을 선별하였다. 선별된 hybridoma는 추가적인 배양을 실시한 후 복수생산에 공여하였다.

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 냉동보관 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.

나. ELISA system

HRP-MAb conjugates 제작은 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 흔들어서 주었다. 이후 단클론항체를 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들어서 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.

한편, 단클론항체가 흡착된 plate를 준비하기 위하여, 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.

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. E01 혹은 E03을 capture로 사용하고, 역가가 가장 높았던 E02를 detector로 사용하였을 때 가장 강한 반응을 나타내었다

ELISA의 순서는 다음과 같다, 준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 아포 부유액을 PBS-T에 희석하여 well당 100 μ l씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이후 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 (대조과장 492nm)에서 흡광도를 측정하여, 각 단클론항체의 조합중 발색반응이 가장 우수한 pair를 흡착용 항체 및 접합체 제조용 항체로 선정하였다.

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. Figure 16-3과 같이 1 \times 10⁵ spore/ml의 검출감도를 보였다.

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

3. 면역분석법에 의한 kSBV 예방치료제 효능검증법

SBV는 수년전 토봉의 폐멸에 이를 정도로 창궐하였으며, 이에 대한 진단 및 치료의 필요성이 절실히 필요하였으나, 연구를 위한 야외주 시료입수 조차도 어려울 정도로 이미 큰 피해를 입혔다. 다행히 2014년도에 하절기에 전국적인 네트워크를 통하여 비로서 감염유충의 수집이 가능하였으며, 이를 이용하여 감염원 야외주 바이러스의 항원화가 가능하게 되었다.

가. 감염충체로 부터의 면역원의 준비

유제화한 유충을 SGUC를 통하여 virus fraction을 수확하고 이를 BALB/c 마우스에 면역시켰으며, 특이항체를 분비하는 hybridoma clone을 선정하여 sandwich ELISA를 개발할 예정이다. SGUC는 다음과 같이 수행하였다. 즉, 바이러스에 감염된 유충의 사체를 -70℃에 보관하였으며, 약 20g의 양을 1회 정제의 단위로 사용하였다. 이때, 바이러스의 신선도를 유지하기 위하여 0.1%되게 NaN₃를 추가하였다. 특히, 동결, 해동 등 단백질 안정성에 영향을 주는 행위는 가급적 회피하였다. 냉장상태에서 막자로 유제화한 후 부유물질들을 제거하기 위해 4℃, 5,000 x rpm으로 5분간 원심분리하여 상청을 회수하고 냉장(4℃)보관하였다(만약 부유물이 존재할 경우, SG가 흐트러져서 분리가 용이하지 않은 결과가 나타난다).

상기 과정을 반복하여 얻어진 상층액들은 35,000xG의 냉장조건(4℃)에서 90분간 원심분리하였다. 이때 50% sucrose 0.5ml의 쿠션을 가하여 tube (38ml tube) 하층에 형성되는 단백질 침전을 방지하였다. 실험 전날 PBS에 Sucrose를 필요량만큼 녹여서 10%, 30%, 50% Sucrose in PBS용액을 만든다. 면역용으로 사용할 바이러스 처리의 경우에는 No NaN₃용액을 사용하되 Standard sample로 사용해야 할 경우 0.1% NaN₃PBS를 사용한다. 시료의 주입 및 회수를 위하여 18g 주사기 바늘의 끝부분을 편평하게 자르고, pipette aid와 10 ml pipette tip을 준비한다.

하층부의 약 5ml을 회수하여 PBS로 20ml되게 희석한 후 SG층 (10%: 10ml, 30%: 5ml, 50%: 1ml)에 조심스럽게 넣고, 바이러스가 추가된 후 남은 부분을 PBS로 채운다. 이후 다시 4℃ 20,000 rpm(141,000 x G) 조건으로 2시간동안 원심분리하였다. 육안으로 다소 불투명한 바이러스층이 확인되었으며 이를 1ml씩 분획하여 PCR을 통하여 바이러스의 층을 확인하고 단백질 농도를 확인한 후 면역원으로 사용하였다.

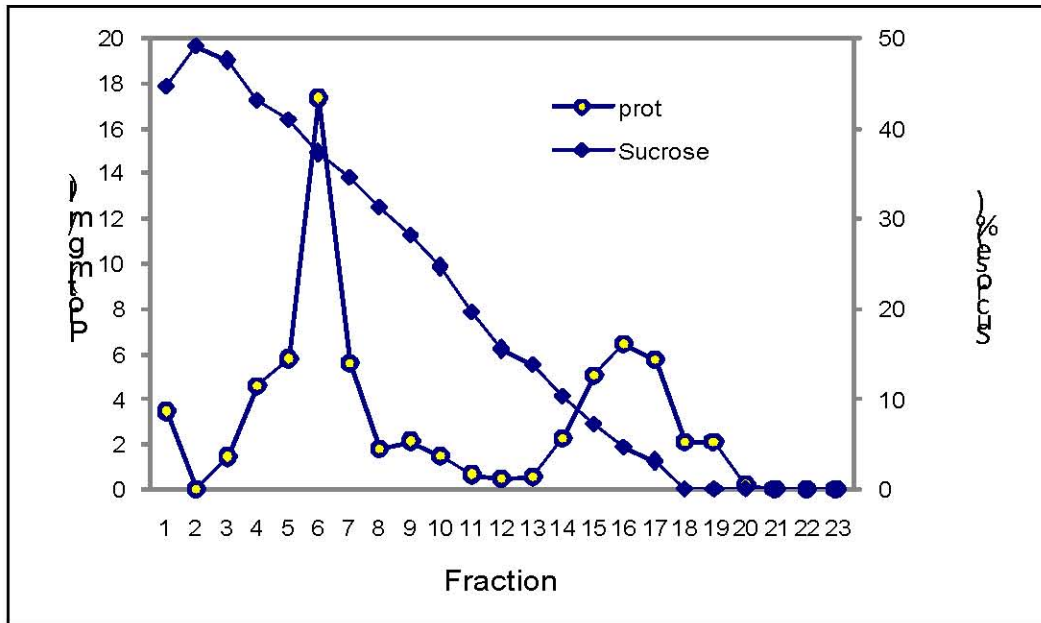


그림 16-2. SGUC에 의한 감염 larvae 유제분획의 자당농도별 단백질농도

나. kSBV 감염 현장적용 ICG 시제품

현장검사법의 제품화를 위하여 바이오노트사에 시작품을 제작 의뢰한 kSBV 검출용 immunochromatography kit의 실험 결과는 다음과 같았다. 즉, 제조합 방법으로 제작된 4개의 특이 단백질 (pET32a-SBV-VP1, pQE30-kSBV-VP2, pMAL-DWV-VP1, pMAL-DWV-VP1-VP3)를 항원으로 사용하여 본 실험을 진행하였다.

4개의 특이 단백질은 과거 발현 여부가 확인이 된 단백질이며, 정제가 되지 않은 상태로 -20도에 보관되어 있던 것을 사용하였다. ICG의 protocol에 따라 각기 특이단백질 50ul를 kit에서 제공한 buffer 300ul와 섞은 후, voltex를 이용하여 10초간 mix를 진행하였다. 이 후, 상온에서 1분간 정치 후 혼합액 중 90ul를 kit의 시료 투입구에 투여하였다. 반응 여부의 최종판정은 시료 투입 후 1min, 5min, 10min, 15min의 시간이 지났을 때 확인하였다.

아래의 그림과 같이 시료투여 후 1분 후에는 검사 line에 반응이 나타나기 시작하여 5분에는 판정이 가능한 정도로 명확한 반응 line이 관찰되었다. SBV진단 키트이기는 하나, 본 실험 결과 제작시 사용하였던 SBV-VP1뿐만 아니라, kSBV-VP2, DWV-VP1, DWV-VP1-VP3의 제조합 단백질에서 또한 모두 반응이 일어나는 것을 확인하였다.

이러한 결과에 의하면, 시작품으로 제작한 ICG kit은 SBV 뿐 아니라 꿀벌에 감염하는 여타의 바이러스들의 검출 스크리닝에도 응용할 수 있을 것으로 사료되었다.

투여 전



그림 16-3. 시료 투여전이며, 4개의 kit 모두 육안상으로 이상이 없다.

1 min



그림 16-4. 육안상으로 SBV-VP1, DWV-VP1, DWV-VP1-VP3에서 Positive 한 결과가 나온 것으로 확인이 된다.

WSBV-VP2의 경우에는 희미하게 라인이 보이는 것으로 확인이 되었다. 투여한 용액은 1분내에 모두 전개가 되었다.

5 min



그림 16-5. 육안상으로 모든 시료에서 Positive 한 결과가 나온 것으로 확인이 되었다.

10 min



그림 16-6 육안상으로 모든 시료에서 Positive 한 결과가 나온 것으로 확인이 되었다.

15 min



그림 16-7. 15분은 kit 메뉴얼상 반응이 일어나는데 필요한 시간이라고 되어 있다.

모든 시료에서 Positive 한 결과가 나온 것으로 확인이 되었다. SBV-VP1, kSBV-VP2, DWV-VP1, DWV-VP1-VP3 제조함 단백질을 투여한 결과

제 17절. 꿀벌유래 세포배양을 통한 바이러스 배양법 개발

현재까지 *in vitro* system의 곤충세포주 확립을 위한 다양한 시도가 있었다. Grace는 1962년 emperor moth (*Antheraea eucalypti*)의 난소 조직으로부터 세포주를 확립하는데 최초로 성공했다. 또 곤충세포를 배양하고 세포주를 얻기 위한 새로운 방법과 기술에 대한 연구가 활발히 이루어져 그 결과 현재 500개 이상의 continuous insect line이 확립 되어있다.

그러나 확립된 세포주의 대부분은 Dipteran(쌍시류, i.e., 등에, 파리, 모기) 또는 Lepidopteran(인시류, i.e., 나비, 나방)으로부터 기원한 것이며 Hymenopteran(막시류, i.e., 벌, 개미)로부터 확립된 세포주는 슬나방 잎벌(*Neodiprion lecontei*)과 포식 기생벌인 *Trichogramma pretiosum*, *T. confusum*, *T. exiguum*, *Mormoniella vitripennis*, *Hyposoter didymator*의 6가지 종에 한정된다.

꿀벌은 꿀, 프로폴리스, 로얄제리를 생산하며 세계적으로 그 가치를 높이 평가받는다. 그러나 꿀벌의 가장 중요한 기능은 식물의 수분을 돕는 것이다. 꿀벌의 수분에 의존하는 어떤 상품화된 식품의 생산에서, 꿀벌이 존재하지 않는 경우 그 수확량은 90% 이상 감소했다는 보고가 있다. 꿀벌의 경제학적, 생태학적 중요성에도 불구하고 현재 control된 *in vitro* system에 대한 연구는 많이 이루어지지 않은 상황이다. 꿀벌 개체수는 질병, 기생충, 살충제, 생물학적 환경, 사회 경제적 요소의 영향을 받는다.

사회 경제적인 요소에서 벗어나, 지난 몇 해 동안 꿀벌 군체의 급격한 소실이 발생해 왔으며 미국의 Colony Collapse Disorder(CCD)는 과학자와 대중의 큰 관심을 얻어 그러한 광범위한 군체의 소실이 일어나는 원인에 대한 연구가 시작되었다. 한국의 경우, 꿀벌은 "수의사법" 및 "가축전염병예방법"의 정의 상 직무대상동물 또는 신고대상가축으로 규정되어 있으며 꿀벌 부저병(foulbrood)이 가축의 제 2종 법정전염병으로 규정되어 있음에도 불구하고 수의사나 국가 수준의 큰 관심을 받지 못하였다.

그러나 양봉산물에 대한 수요증대, 양봉농가에 대한 소득증대와 더불어 1946년 이래 전염성이 매우 강한 미국 부저병의 발생보고가 잇따름에 따라 국내에서의 꿀벌 질병에 대한 연구도 시작되었다. 바이러스, *Nosema ceranae*(미포자충), *Varroa destructor*(진드기), 살충제, 살비제(acaricides), 유전적 다양성의 소실, 서식지의 소실 등은 꿀벌의 생산성과 생존율에 부정적인 영향을 미치며, 특히 *Paenibacillus larvae* (American foulbrood의 원인균), *Melissococcus plutonius* (European foulbrood의 원인균)는 벌방(honey comb) 안에서 성장 중인 larvae에 감염하여 개체수를 감소시킨다.

Cell culture system은 병원체와 숙주세포의 상호작용에 대한 평가가 신속하게 이루어지도록 하며 이러한 병원체의 꿀벌 세포의 성장과 생존에 대한 영향을 알아보는 데에도 중요하다. 따라서 꿀벌 군체에 만연하고 있는 부저병이나 바이러스 감염증, 절대 세포내 기생체 등의 연구에 유용하게 사용될 control된 *in vitro* system 확립이 필요한 시점이다. 이로부터 꿀벌 세포주

에 대한 연구는 단계적으로 진행되어 왔다. Embryo와 유충 및 번데기 등 꿀벌의 각 발생학적 시기를 재료로 하여 세포 배양에 시도한 연구가 있었다.

Kreissl 등과 Barbara 등은 번데기의 antennal lobe를 이용하여 이로부터 신경세포의 단기간 배양(4주 이하)이 가능함을 증명하였다. 비교적 최근에는 Kitagishi 등이 human c-myc proto-oncogene을 꿀벌 배아 세포에 lipofection하는 방법으로 전이유전자의 발현가능성과 세포의 장기간 증식 및 생존을 촉진하는지 알아보는 연구를 수행하였고 그 결과 8개월의 follow-up 기간 동안 생존이 가능한 cell line을 확립하는 데 성공하였다. Gobfirsch 등 (2013)은 꿀벌(*Apis mellifera*)의 embryonic tissue로부터 초대배양과 cell line 냉동보존을 통해 18대 이상의 계대배양에 성공했다고 보고 하였다.

한편, 로얄제리 (왕유(王乳)라고도 한다)는 꿀벌 중 일벌이 유충을 기르는 시기에만 타선이 포육선으로 발달하여 분비되며, 일벌이 될 애벌레를 포함한 집단 내 모든 애벌레에게 먹이로 제공된다. 이러한 로얄제리는 담황색의 버터 상태로 된 액체로 특이한 향기가 있으며, 공기에 접촉하면 유효성분이 변화하여 효능이 저하된다고 한다.

성분으로는 단백질이 20~30 %, 탄수화물 15 %, 지방 10~15 %, 수분 50~60 %를 함유하고, 그 밖에도 여러 종류의 비타민을 풍부하게 함유하고 있다. 여왕벌의 유충을 기르는 왕대(王臺) 1개에 0.1~0.5 g의 로얄젤리가 저장되어 있다. 이는 강장·감정·영양제로, 피로·권태·쇠약·빈혈·체질개선·갱년기 장애·성기능부전·피부미용·노화방지 등에 이용된다. 벌들은 여왕벌이 필요하게 되면, 선택된 한 애벌레에게 생후 첫 4일간 오로지 로얄제리만을 대량으로 공급한다. 이렇게 초기에 집중적으로 영양 공급된 애벌레는 알을 낳을 수 있을 만큼 성숙된 난소를 포함해 여왕벌의 형태를 갖추게 된다. 이처럼 로얄제리는 유충의 성장에 필요한 많은 비타민류, 미네랄, 아미노산 등의 영양소를 풍부하게 가지고 있으므로 꿀벌 세포의 성장에도 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다. 따라서 이 연구의 목적은 분별화된 꿀벌 세포주를 확립하는 첫 단계로서, 로얄제리를 이용한 꿀벌 세포 초대배양에 성공시키는 것이다.

Composition of royal jelly (form Lercker et al., 1984 and 1992)

	Minimum	Maximum
Water	57%	70%
Proteins (N x 6.25)	17% of dry weight	45% of dry weight
Sugars	18% of dry weight	52% of dry weight
Lipids	3.5% of dry weight	19% of dry weight
Minerals	2% of dry weight	3% of dry weight

표 17-1. 로얄제리의 구성(form Lercker et al., 1984 and 1992)

로얄제리의 조성에 대한 연구는 과거부터 계속되어 왔다. 로얄제리의 수많은 화학 분석은 수년에 걸쳐 발표되었다. 로얄 젤리의 주요 성분은 물, 단백질, 당, 지질, 미네랄 염이다. 또한 로얄제리는 현저한 변형 발생하더라도 조성물은 상대적으로 일정하게 유지된다. 물은 신선한 로얄 젤리의 3분의 2 정도를 차지하고 있다, 건조 중량에서 단백질 및 당은 가장 큰 부분을 차지한다. 이밖에 질소 물질, 단백질(평균 73.9%) 중 6개의 주요 단백질 (Otani 등, 1985)에 대한 보고와 당 단백질 (Takenaka, 1987)에 대한 보고가 있다. 유리 아미노산류 및 질소 물질의 펩타이드 (Takenaka, 1984)와 생체에 필수적인 29개의 아미노산 및 유도체가 확인이 되었다. 가장 중요한 아스파라긴산과 글루탐산과 유리 아미노산인 프롤린 및 리신 (Takenaka, 1984, 1987)에 대한 보고도 있다. 효소는 포도당 산화 효소를 포함하여 (Nai 등, 1973) 인산 및 콜린 에스테라제와 인슐린 유사 물질의 존재도 Kramer(1977, 1982) 등에 의해 확인되었다.

로얄제리의 당은 대부분 꿀과 비슷한 비교적 일정한 비율로 과당과 포도당으로 구성되어 있으며, 많은 경우에 과당과 글루코스가 당 총량의 90%를 차지한다. 반면에 자당 함량은 상당히 다양하게 나타난다. 그밖에 존재하는 다른 당은 맥아당, 트레할로스, 멜리비오스, 리보오스 및 erlose (Lercker 등, 1984, 1986, 1992) 등이 있다.

지질 함량은 독특하다고 사료가 된다. 지질 분획 및 드문 비정상적인 구조를 갖는 유리 지방산 (건조 중량)이 80~90%를 차지한다. 이들은 일반적으로 동물 및 식물 물질에서 발견되는 14개 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 지방산과 달리 대부분 단쇄 (탄소수 8 ~ 10) 하이드록시 지방산 또는 디카르복실산이다. 유리 지방산 이외에 지질 분획에서는 (콜레스테롤을 포함) 일부의 중성지질, 스테롤 및 밀랍 추출물과 유사한 탄화수소 비누화 분획 (Lercker 외, 1981, 1982, 1984, 1992)이 관찰된다. 로얄제리의 총 에쉬 함량은 신선한 중량의 약 1%이고, 건조 중량에서는 2~3%를 차지한다. 주요 미네랄 염은 칼륨, 칼슘, 나트륨, 아연, 철, 구리 및 망간 순서로 포함되어 있다 (Benfenati 등, 1986).

로얄제리는 비타민 매우 풍부한 것으로 보여 많은 연구의 대상이 되어왔다. 지금까지 여왕벌의 엄청난 다산의 능력은 지용성 비타민인 비타민 E 때문으로 여겨졌으나 그렇지 않은 것으로 나타났다. 또한 비타민 A, D와 K는 (Melampy, 1939) 존재하지 않는 것으로 보고가 되었다.

Vitamin content of royal jelly in μ g per gram of fesch weight (Vecchi et al., 1988)

	Thiamine	Riboflavin	Pantothenic Acid	Pyridoxine	Niacin	Folic acid	Inositol	Biotin
Minimum	1.44	5	159	1.0	48	0.130	80	1.1
Maximum	6.70	25	265	48.0	88	0.530	350	19.8

표 17-2. Vitamin content of royal jelly

그 밖에 다양한 화합물의 범주에 속하는 수많은 물질이 로얄제리에서 확인되었다. 이 중 25

개의 핵테로 물질, biopterine 및 neopterin 과 아데노신, 우라딘, 구아노신, 이리딘, 시티딘, 인산염 AMP, ADP, ATP들, 아세틸콜린 등이 발견이 되었다. 하지만 많은 연구자들은 아직 많은 부분을 "아직 알 수 없는 기타 물질"이 매우 많은 것으로 판단을 하고 있다.

이처럼 로얄제리는 그 구성 성분이 모두 알려지지 않았다. 이 때문에 로얄제리를 섭취한 꿀벌(여왕벌)이 그렇지 못한 꿀벌(일벌)에 비하여 40배 이상 오래 사는 것에 대한 정확한 이유는 알 수가 없다. 하지만 로얄제리의 섭취가 꿀벌의 수명에 관여를 한다는 사실은 부인을 할 수가 없다. 이처럼 로얄제리는 유충의 성장에 필요한 많은 비타민류, 미네랄, 아미노산 등의 영양소를 풍부하게 가지고 있으므로 꿀벌 세포의 성장에도 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다. 따라서 이 연구의 목적은 불멸화된 꿀벌 세포주를 확보하는 첫 단계로서, 로얄제리를 이용한 꿀벌 세포 초대배양에 성공하는 것이다.

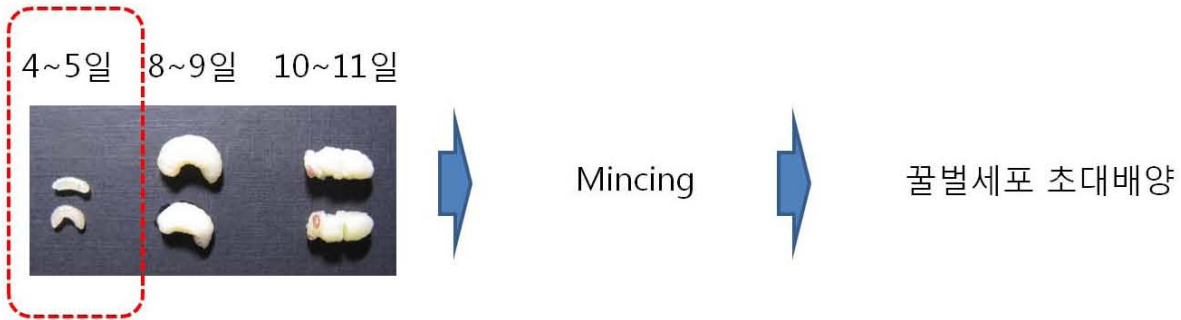
1. 꿀벌유래세포의 초대배양

가. 에벌레의 채집

제주대학교 내에 있는 양봉장에서 수벌의 유충을 채집하여 실험을 하였다. 벌집(honey comb)의 이상 유무를 육안으로 확인한 뒤 4x4 cm 크기로 잘라내었다. 즉시 실험실로 가지고 와서 아직 유충이 살아있는지 상태를 확인하고 70% 알콜에 소독하였다.



그림 17-1. 꿀벌 세포를 배양하기 위하여 채집한 2~6일령의 에벌레와 우화를 위하여 반대기 속에 들어 있던 에벌레의 모습.



✓알에서 부화한지
4~5일령의 애벌레
사용

- ✓ 1mm³ 이하로 절편제작
- ✓ 콜라겐 코팅 디쉬 사용
- ✓ 커버글라스로 압착

- ✓ 배지 : Grace's Insect Medium
- ✓ 첨가 : 10% FBS
Anti-Bio
- ✓ 온도 : 28°C

그림 17-2. 꿀벌 세포를 초대 배양하기 위한 과정의 주요 내용에 대한 모식도.

나. 배지의 조성

일반적으로 곤충세포를 배양하기 위한 배지로 가장 많이 사용하는 것은 Grace's insect medium이다. Grace's insect medium은 곤충 세포의 배양하기 위해 1962 년에 개발되었다. 일반적으로 락트알부민 가수분해물 yeastolate가 포함되어 있지 않기 때문에 L 글루타민, 락트알부민 가수분해물 및 yeastolate 보충하면 그레이스 곤충 중간 일반적인 성장 및 곤충 세포의 유지에 사용될 수 있다.

기본 배지(Basal medium)는 Grace's insect medium에 10% FBS, 0.01% antibiotics (1×10⁴ units/ml of penicillin, 1×10⁴ units/ml of streptomycin), lactalbumin, yeastolate를 첨가하여 만들었다. Grace's insect medium 20ml에 로얄젤리 20ml를 첨가한 후 38°C에서 15분간 교반하였다. 교반을 한 배지를 3000 × g로 15분간 원심분리 하여서 상층액을 수거하였다. 수거한 상층액을 첨가한 완전 배지(complete royal jelly medium, R-medium)는 기본 배지에 각각 10%, 20%, 30%의 로얄제리 상층액을 첨가하여 제작하였다.

다. 초대배양

70% 알콜에 소독한 유충을 가위로 수차례 mincing하여 유충의 조각이 1mm³ 이하가 되도록 하였다. 조직을 단일세포로 분리하기 위하여 1차와 2차를 통하여 효소처리를 하였다. 27°C grace's insect medium 5ml에 0.25% collagenase를 첨가하여 5분 동안 27°C 인큐베이터에서 처리하고, collagenase의 처리가 완료되면 0.01%의 dispase를 첨가하여 5분 동안 반응을 시킨 후 천천히 20번 가량 피펫팅을 하여서 단일 세포로 분리하였다. 상층액을 수거하고 FBS가

20% 함유된 grace's insect medium 10 ml를 첨가한 후 160 x g에서 3분간 원심분리 하였다. 가라앉은 세포만을 R-medium (10%, 20%, 30%)으로 부유시키고 T25 세포배양용 flask에 넣어서 27℃에서 배양하였다.

라. 초대배양 세포의 크로닝

형태학적 및 배양 flask에 부착하는 특성이 서로 다른 4가지 종류의 세포 group이 관찰되었다. 이들을 임의로 A, B, C, D로 이름을 붙였으며 각각의 특징은 다음과 같았다. Group A는 둥글고 구형의 세포로서 배양 flask 의 바닥에 부착하지 않고 배지에 부유하면서 증식하였다. A는 총 7번 계대에 성공하였다.

Group B는 A와 형태는 비슷하게 둥글고 구형이었으나 A보다 조금 더 배양 flask 바닥에 부착하여 증식하였다. B는 총 11번 계대배양하였다. Group C는 총 4번 계대할 때까지 증식하였고 세포의 형태는 다각형이었다. 이 그룹의 세포들은 배양 flask의 바닥에 잘 붙어서 증식하였다. Group D는 가장 오랫동안 세포들이 증식·성장하여 총 15번 계대하는 데 성공했다. 세포의 형태는 bipolar 또는 multipolar 로 방추상의 fibroblast 와 가장 비슷한 형태를 나타냈고 배양 flask 바닥에 잘 붙어서 증식하였다.

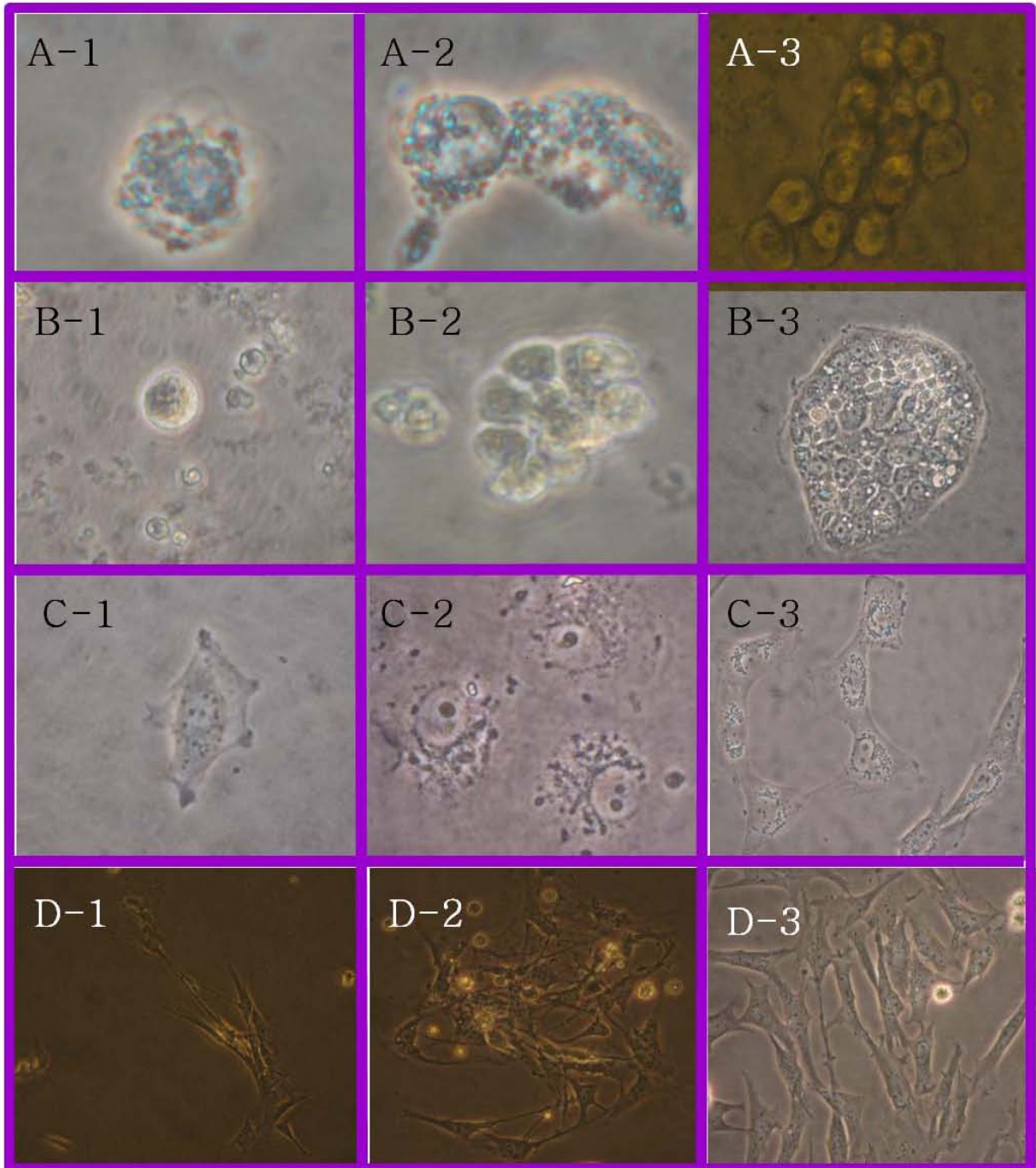


그림 17-3. 초대배양 세포의 현미경사진.

Group A : 7번 계대배양 -부유하는 세포의 특징을 가지고 있다. 부착하지 않는다. A-1; Day 1 (inoculation), A-2; Day 3, A-3; 5 times transferred cells, Group B; 11번 계대배양. 부유하지만 장기간 배양시 바닥에 약하게 부착, B-1; Day 1 (inoculation), B-2; Day 4, B-3; after 4 times subculture. Group C 4번 계대배양 - 부착하여 자라며 세포 질이 등글다, C-1; Day 1 (inoculation), C-2; Day 3; C-3; after 3 times subculture, Group D 가장 오래 계대 배양이 가능하였으며 포유동물의 섬유아세포와 매우 흡사한 모양이다.

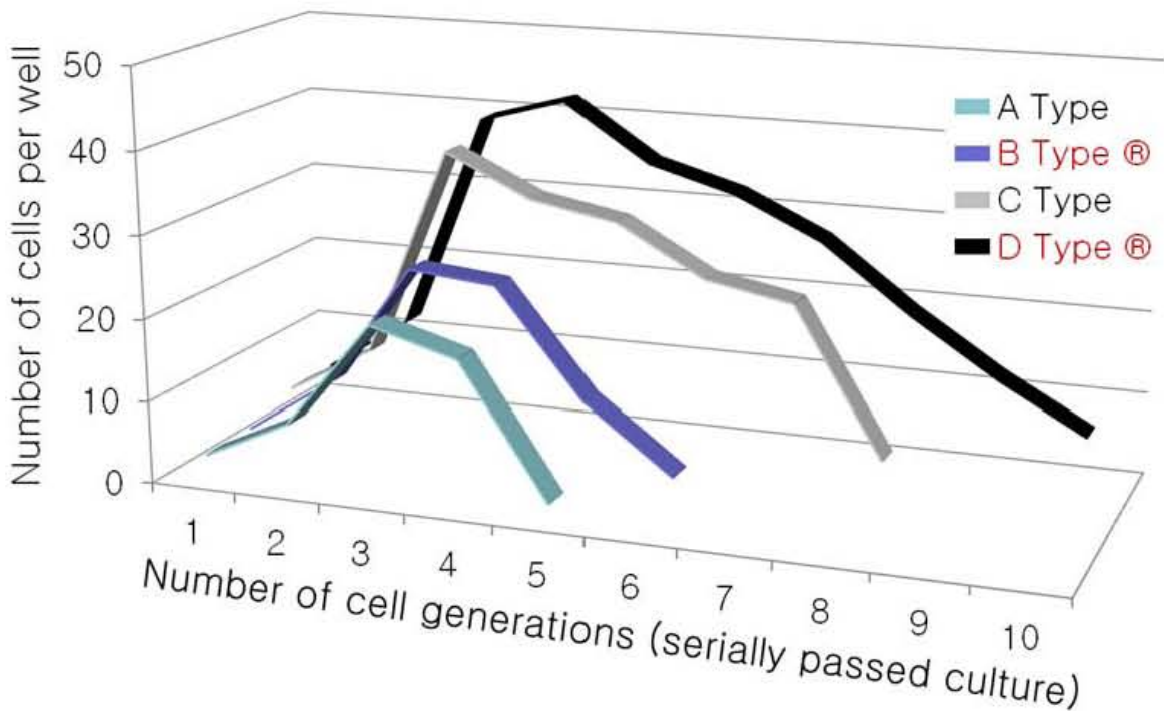


그림 17-4. 4일마다 계대배양 하여 각각의 세대에서 세포 수를 counting 한 결과. D 세포가 세포분열이 가장 왕성하였고, 가장 오래 생존하였다.

초기에는 계대를 함에 따라 모든 group의 세포 수가 증가하지만 어느 시점이 지나면 세포 수는 감소하였다. 특히 A 와 B는 C 와 D보다 세포 수의 감소가 더 일찍 시작되었다. Group A 와 B, C 와 D를 각각 비교해 보면, B는 A보다 세포 수가 더 증가하였으며 감소하기 시작했을 때에는 그 기울기가 A 보다 완만하였다. D는 C보다 세포 수가 더 많이 증가하였으며 더 오랫동안 계대배양이 가능하였다.

또한 세포 수가 감소하기 시작했을 때도 그 기울기가 C보다 완만하였다. 세포 수가 2배로 증식했을 때 계대배양 하여 세포의 doubling time을 관찰한 결과는 다음과 같다. 모든 group에서 공통적인 특징은 계대횟수가 증가할수록 doubling time이 연장된다는 것이었다. 3번째, 4번째 계대 이후에는 각각 group A, B의 세포들이 2배로 증식하지 않았다. Group B는 A에 비해 첫 번째 계대할 때까지 doubling time이 짧았다. 이것은 세포가 2배로 증식하는 속도가 A보다 빠르다는 것을 의미한다.

두 번째 계대 때 B의 doubling time은 A보다 약간 연장되었지만 그 이후로 A는 더 이상 증식하지 않은 반면 B는 3번째 계대할 때까지 세포가 증식하였다. Group C 와 D를 비교했을 때 로얄제리가 첨가된 D는 C에 비해 확연하게 doubling time이 짧고 비교적 꾸준히 세포가 증식하였다.

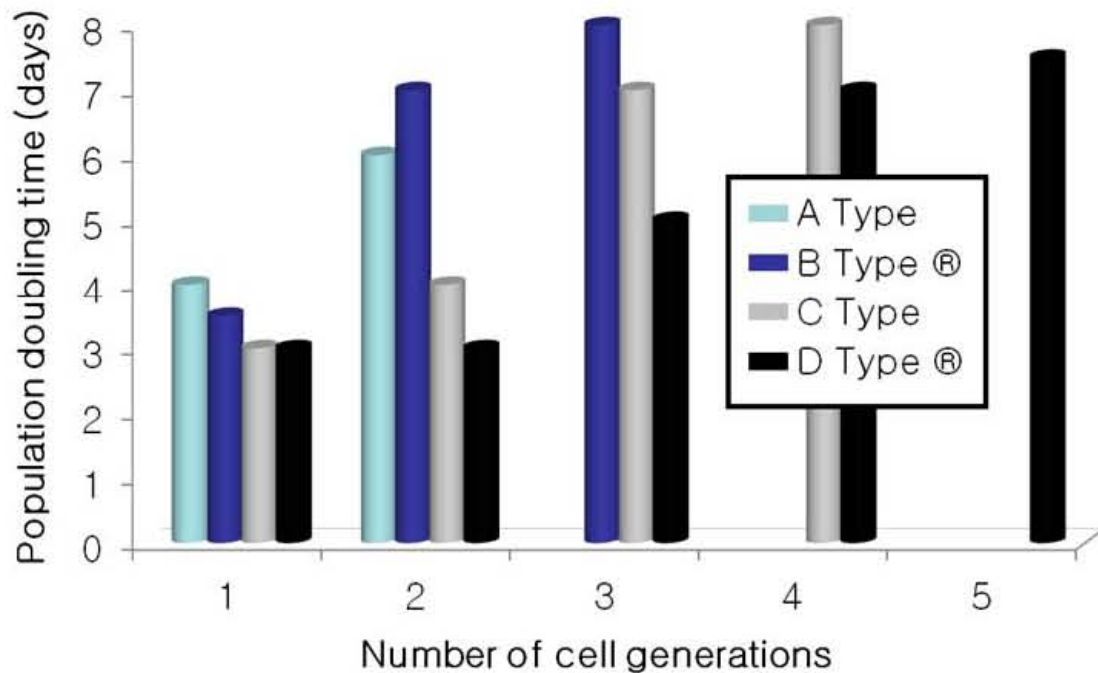


그림 17-5. Group A 와 B와 C 그리고 D에서의 cell population doubling time 의 측정.

Group D의 population doubling time이 가장 짧았으며, Group A는 3번째 계대 이후 세포수가 줄었다. Group B는 4번째 계대 이후 세포수가 줄기 시작하였고, Group C는 5계대 이후 세포수가 줄어들었다.

다. 로알제리 배지를 이용한 세포의 배양

분주를 하고 첫 24시간 후에 배지를 교체해 주었다. 초대배양 세포는 부유하는 특징과 부착하여 자라는 특징을 가지는 2가지 그룹의 세포들을 나누어서 배양 하였다. 초대배양 48시간 후에 조심스럽게 배지를 제거하였다. 세포세척용 PBS를 4 ml 첨가하여 세포를 세척하였다. 세척 후 각각의 flask에 0.01%의 Na_2EDDA (edetate disodium dihydrate)를 1 ml씩 첨가하였다. Na_2EDDA 를 첨가하고 3분 후 flask를 손가락으로 가볍게 쳐주어서 부유 세포가 떨어지도록 하였다.

부유세포가 다 떨어지면 10% R-medium를 5 ml 첨가하여 부유세포만을 수거하였다. 세척을 완료하여 부착 세포만이 자라고 있는 flask에 10% R-medium 5 ml를 첨가하여 배양 하였다. 부유세포와 부착세포를 10% R-medium과 20% R-medium 그리고 30% R-medium를 이용하여 배양하면서 세포의 분열능력을 관찰하였다.

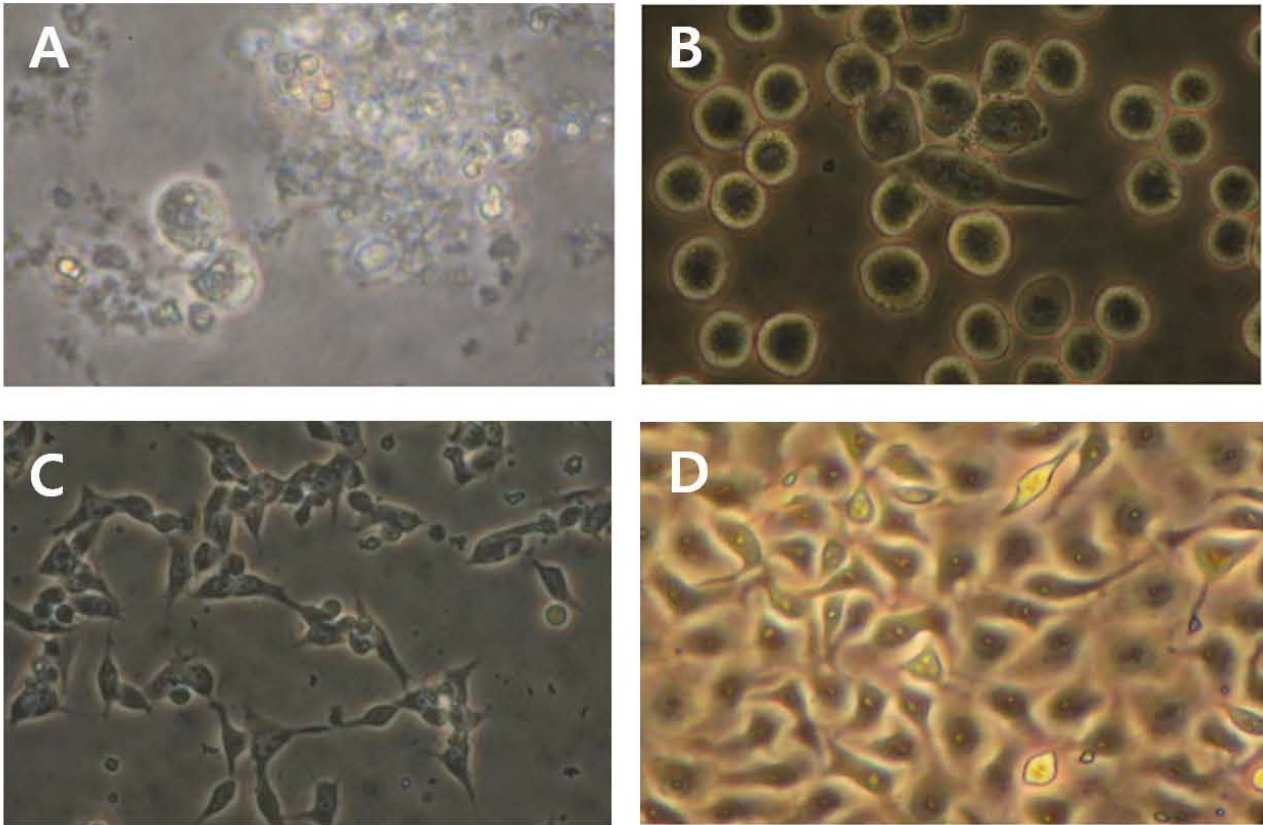


그림 17-6. 로알젤리를 첨가한 배지(R-medium)를 이용한 초대배양 사진.

A: JNUB-1 세포로 초기 부유세포 배양 모습 : 부유세포들이 배지속에서 부유하고 있다, (20% R-medium), B: JNUB-1 세포로 배양 48시간 후 : 부유세포들이 flask 바닥에 가라 앉은 모습, 손으로 flask에 충격을 주도 부유하지 않는다(부착세포보다는 약한 결합능력을 보인다), C: JNUB-2 세포로 초기 부착세포 배양 모습(20% R-medium), D: JNUB-2 세포로 부착세포 배양 96시간 후 모습.

형태학적 및 배양 flask에 부착하는 특성이 서로 다른 2가지 종류의 세포 group이 관찰되었다. 이들을 임의로 JNUB-1, JNUB-2로 이름을 붙였으며 각각의 특징은 다음과 같다.

JNUB-1은 둥글고 구형의 세포로서 배양 flask 의 바닥에 부착하지 않고 배지에 부유하면서 증식하였다 (장기간 배양 시 바닥에 약하게 부착). JNUB-2 세포의 형태는 양 끝이 뾰족한 구형으로 (장기간 배양 시 세포질이 더 풍부해졌다)형태는 bipolar 또는 multipolar로 방추상의 fibroblast 와 가장 비슷한 형태를 나타냈고 배양 flask 바닥에 잘 붙어서 증식하였다.

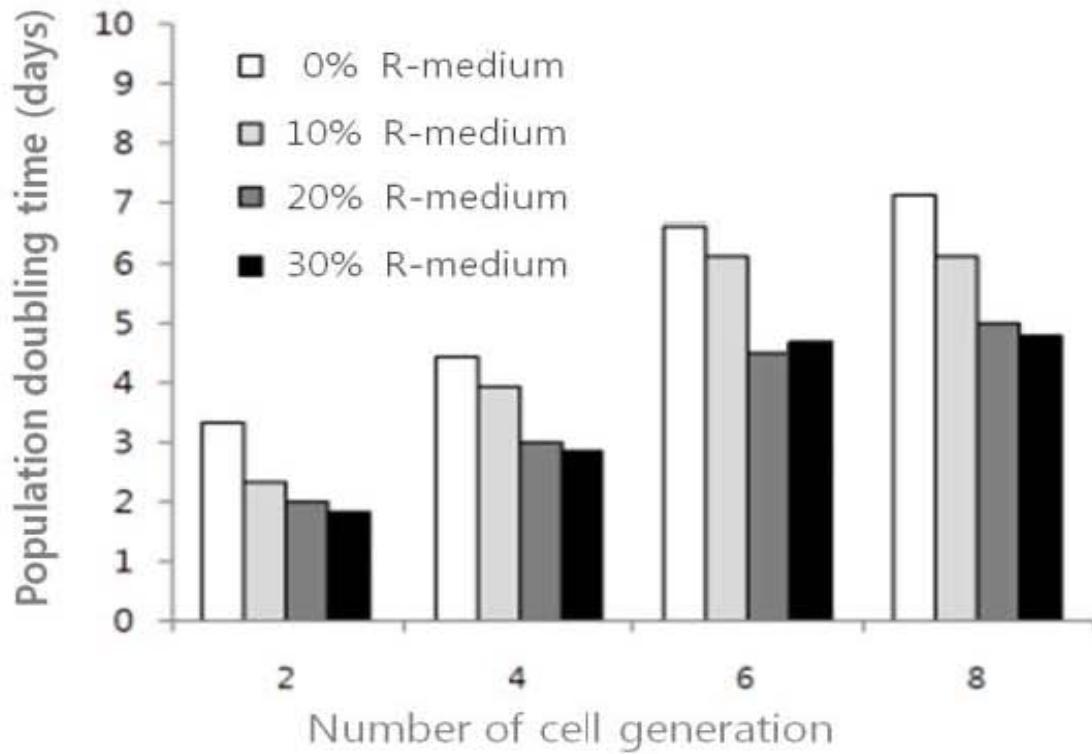


그림 17-7. JNUB-1 세포에서의 R-medium을 이용한 계대배양의 시 세대수에 따른 population doubling time의 변화.

0%의 R-medium을 이용한 경우보다 10% 이상의 R-medium을 이용하였을 시 population doubling time이 줄어들음을 확인할 수 있다. 20% R-medium을 사용하였을 시 가장 좋은 효과를 보였으며, 20% R-medium이나 30% R-medium은 비슷한 효과를 나타내었다.

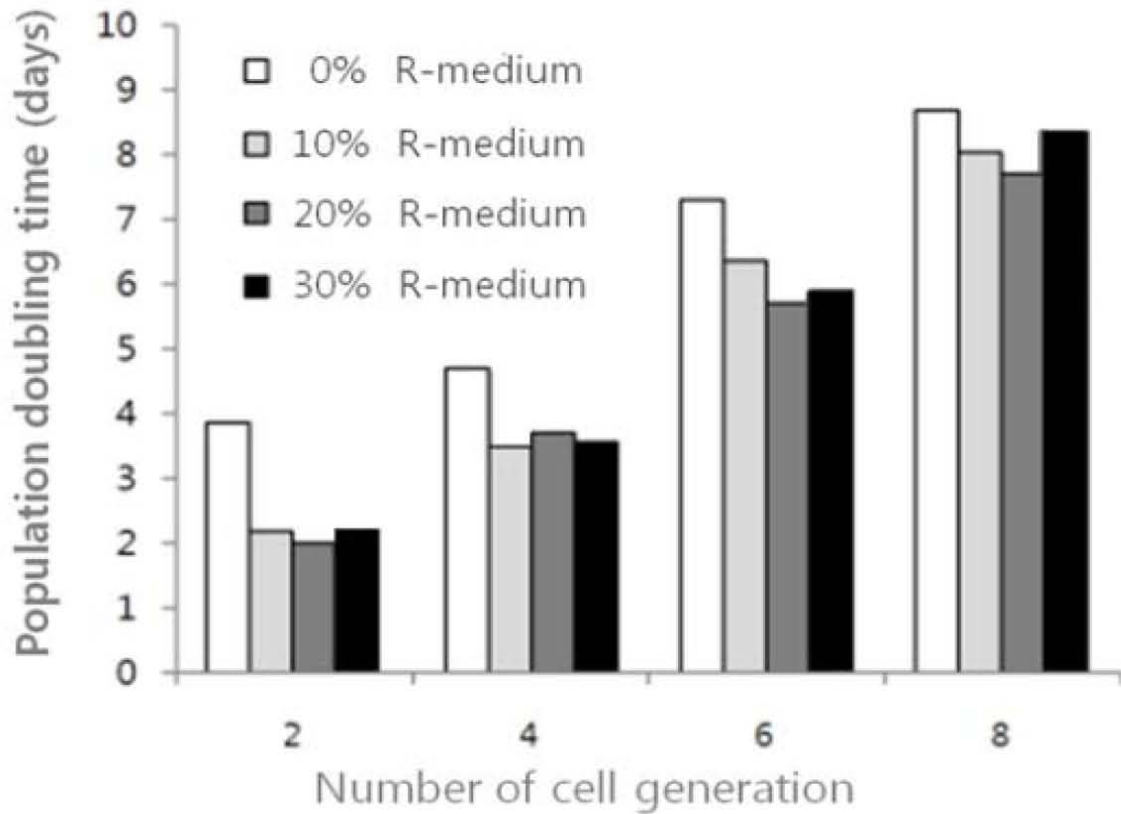


그림 17-8. JNUB-2 세포에서의 R-medium을 이용한 계대배양의 시 세대수에 따른 population doubling time의 변화.

0%의 R-medium을 이용한 경우보다 10% 이상의 R-medium을 이용하였을 시 population doubling time이 줄어들음을 확인할 수 있다. 10% 와 20% 그리고 30%의 R-medium에서 모두 비슷한 효과를 나타내었다. 하지만 8세대 이후에서는 0% R-medium와 큰 차이가 없었다.

Group A의 냉동보관 시 세포의 생존율

	20140814	20140920	20141018	20141102	20141214	20150309
최초 제작 세포수	4×10^4	4×10^4	4×10^4	2×10^5	2×10^4	2×10^4
해동 후 생존한 세포수 (보관 개월 수)	8.8×10^3 (15개월)	8.4×10^3 (11개월)	8×10^3 (12개월)	4.8×10^4 (2개월)	3.6×10^4 (7개월)	5.4×10^4 (5개월)
생존율(%)	22 %	21 %	20 %	24 %	18 %	27 %

그림 17-9. 꿀벌세포를 액체질소에 냉동 보관 후 해동 시 세포의 생존율을 보관 기간에 따른 비교결과

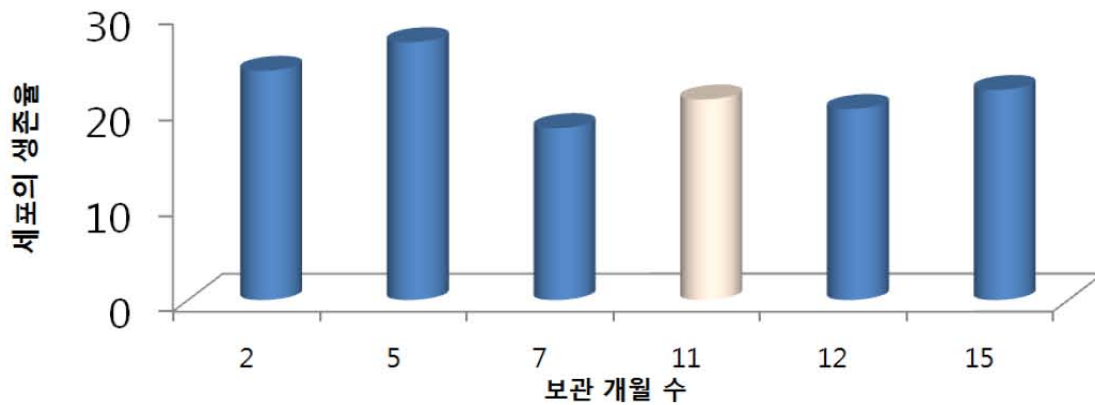


그림 17-10. Group A의 세포를 DMSO를 첨가하여 액체질소에 보관 후 해동을 하여 세포의 생존율을 비교한 결과.

보관 개월수에 따른 세포의 생존율은 차이를 보이지 않았다. 전체적인 세포의 생존율은 22% 수준으로 나타났다.

결과적으로 로얄제리가 함유된 R-medium을 이용하는 것이 세포의 성장 속도와 분열 속도를 증가시키기는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 세포를 실험에 이용할 수 있을 정도로 충분히 증식 시키거나 오랜 기간 동안 계대배양 하는 것은 불가능하였다.

24 시간 배양시 세포의 생존율

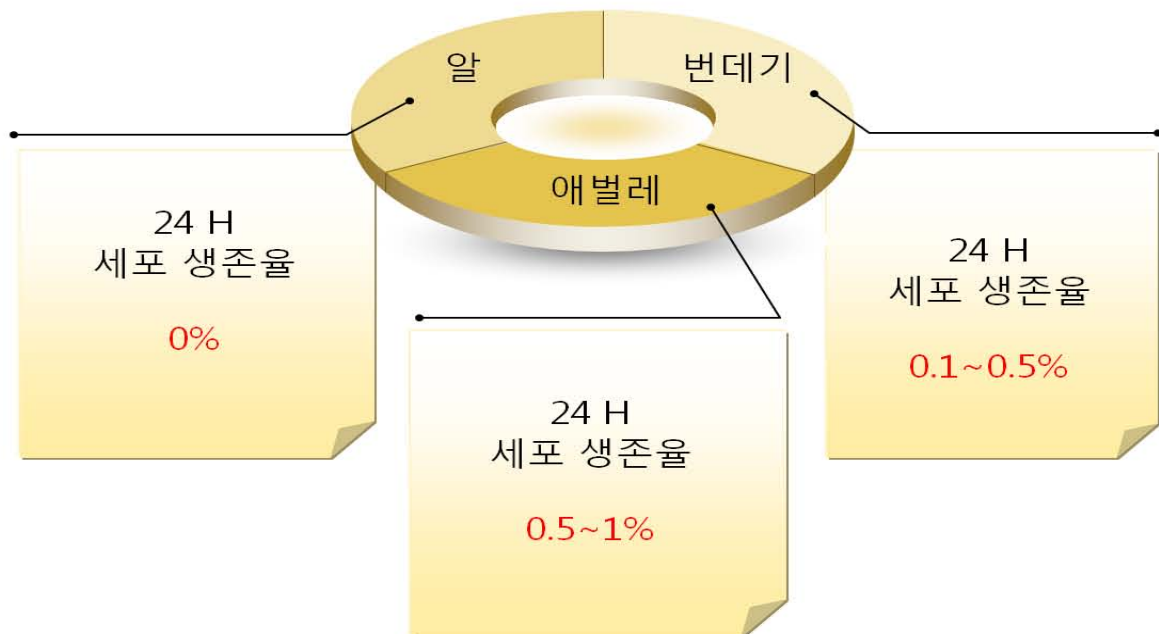


그림 17-11. 꿀벌의 발생 단계별 조적을 이용하여 초대배양 시 세포의 생존율.

초대배양 24 시간이 지나서 세포의 생존율은 애벌레를 사용하는 경우가 가장 높게 나왔다.

2. 벌꿀세포의 불멸화를 유도할 벡터의 제작

꿀벌세포를 다양한 방법으로 초대배양한 결과 실험에 사용할 정도로 충분히 안정적인 세포를 얻는 것은 불가능 하였다. 따라서 초대배양세포를 이용하여 유전자도입을 통한 세포의 불멸화를 하고자 하였다.

유전자 변형을 통한 곤충세포의 불멸화에 대한 연구는 아직 이루어 진적이 없다. 본 연구에서는 곤충세포를 불멸화하기 위하여 C-Myc 유전자를 도입하고자 하였다. C-Myc은 핵내 DNA결합단백질을 코드하는 암유전자의 하나로 각종 암세포에서 유전자 증폭을 나타낸다. c-myc는 증식자극에 의해 일괄적으로 발현이 상승하는 것으로 알려져 있다.

하 등의(1995, 곤충세포-배큘로바이러스 시스템에서 재조합 단백질 생산을 위한 최적 감염시기 및 배지조성) 연구결과를 보면 “유전자 재조합 단백질 생산을 위한 곤충세포- 배큘로바이러스 시스템에 있어서, 바이러스에 감염 시키는 시기가 늦을수록 재조합 단백질의 발현이 낮게 나타났다. 이것은 높은 세포농도일수록 단위 세포당 낮은 발현율을 의미하므로 재조합 단백질 생산을 위해 감염시기에 대한 최적화의 필요성을 보여주며, 재조합 단백질의 최대 생산을 위한 최적 감염시기의 존재를 실험적으로 입증하였다.

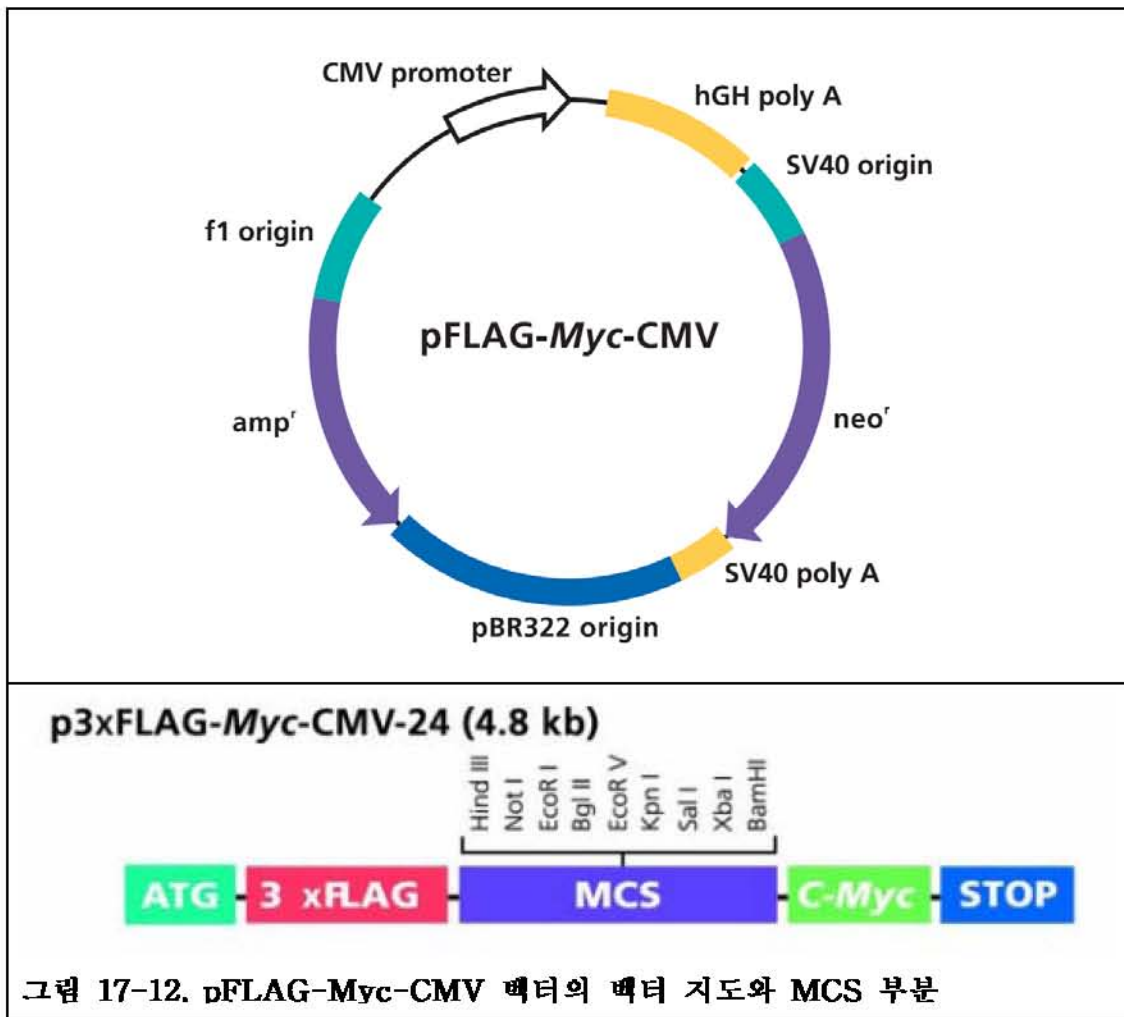
또한 배지에 5% 누에체액을 보강함으로써 발현율이 증가하였고, 이것은 누에 체액 첨가로 인해 세포내 바이러스 숫자가 증가하고 감염 후 세포의 생존성이 오래 유지되는 것에 기인하는 것으로 생각된다. 고농도 세포배양을 위해 yeastolate를 첨가하고, 재조합 단백질 발현을 위해 누에 체액을 첨가함으로써 β -galactosidase의 생산이 10배 정도 증가하였다.”고 보고하였다.

또한 이 등의(1995, Baculovirus-곤충세포 상호반응에 대한 생화학적 연구) 연구결과를 보면 “T-flask와 air-lift 생물반응기를 이용하여 *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV)의 Tn5B1-4 세포에의 감염시 fatty acid 및 lipid, mannose, folic acid, CaCl₂등의 배지 첨가물이 재조합 β -galactosidase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Cholesterol, tocopherol, tricaprilyn 또는 mannose를 첨가하거나 folic acid를 보강첨가 했을 때 AcNPV의 재조합 β -gal 생산은 향상되었으나 CaCl₂의 보강 첨가는 β -gal 생산을 높이는데 효과적이지 못했다. Air-lift 생물반응기에서 0.34 mM cholesterol, 2.2 mM mannose 및 0.045 M folic acid를 보강 첨가한 배지를 이용하였을 때 재조합 β -gal 생산은 basal medium에 비해 약 2배 정도의 증진 효과가 있었다.”고 보고하였다.

이와 같은 연구 결과를 종합하여 보면 바이러스의 감염 시기는 늦추고 basal medium 보다는 기능성의 첨가물을 첨가하는 것이 유전자 발현에 더욱 도움이 될 것이라 예상을 할 수 있다.

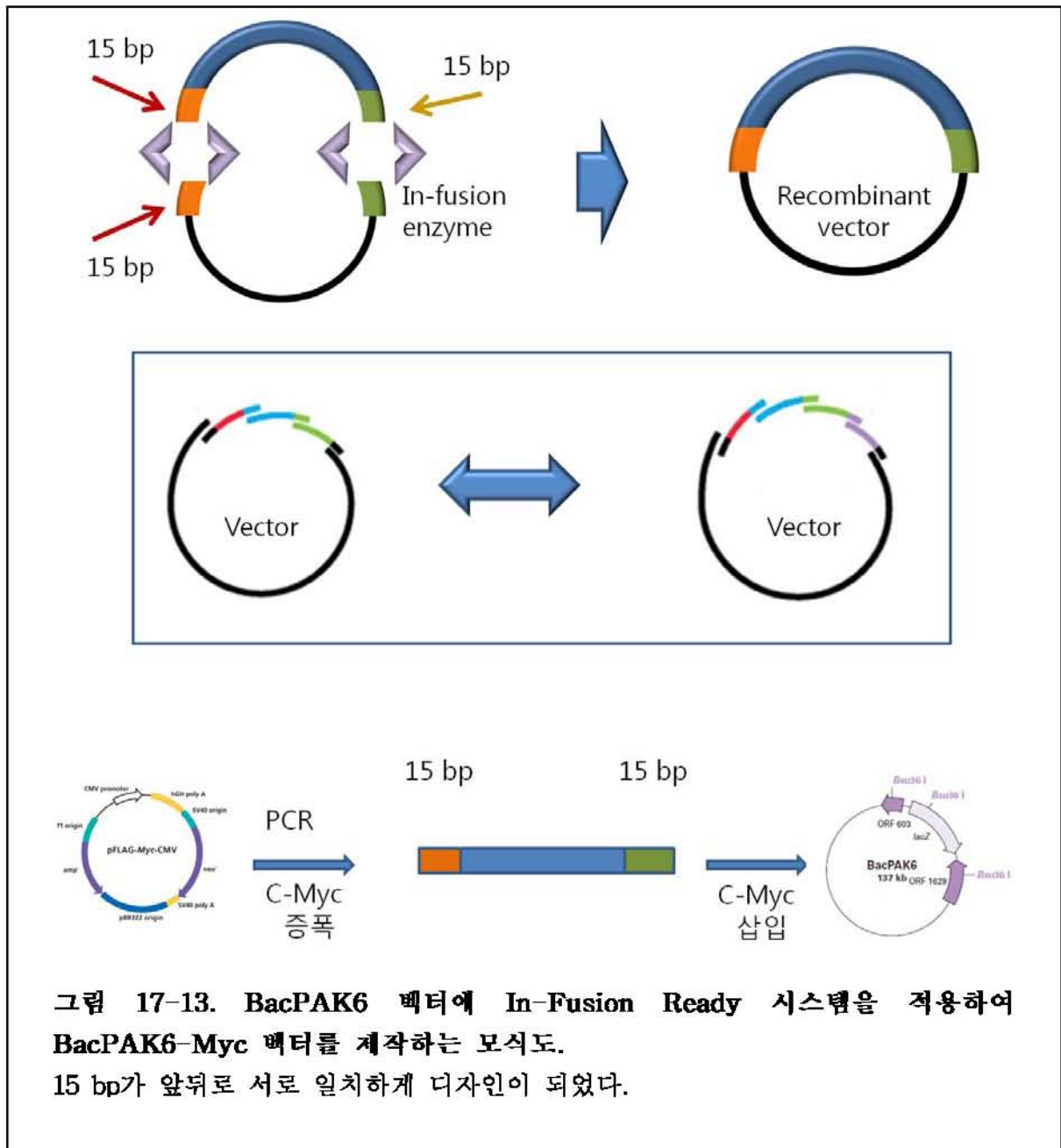
C-Myc 유전자를 도입시키기 위하여 pFLAG-Myc-CMV 벡터를 사용하였다. 하지만 이 벡터는 마우스와 포유동물 세포에 유전자 도입을 하기 위하여 제작된 벡터이다. 곤충세포에 유전자도입의 성공률을 높이기 위하여 곤충유래의 baculovirus expression system인 BacPAK

Baculovirus expression system을 추가적으로 제작하였다.



BacPAK 벡터의 목적 유전자는 shuttle vector로 삽입되고 linearized BacPAK6 Viral DNA 와 함께 곤충 숙주 세포로 cotransfection 된다. BacPAK6 DNA에는 baculovirus genome의 필수 요소가 없지만 DNA가 vector와 재조합하면 필수 요소가 복구되고 목적 유전자가 baculovirus genome으로 끼어 들어간다. 재조합 후, 몇 개의 바이러스 plaque를 선택, 정제하여 재조합 표현형을 확인한다. 그런 후 새로 분리된 재조합 바이러스를 증폭하여 곤충 세포 배양액에 감염시키면 많은 양의 목적 단백질을 만들어낼 수 있다.

BacPAK6 벡터에 In-Fusion Ready 시스템을 적용하여 BacPAK6-Myc 벡터를 제작하였다.



BacPAK Baculovirus 발현 시스템

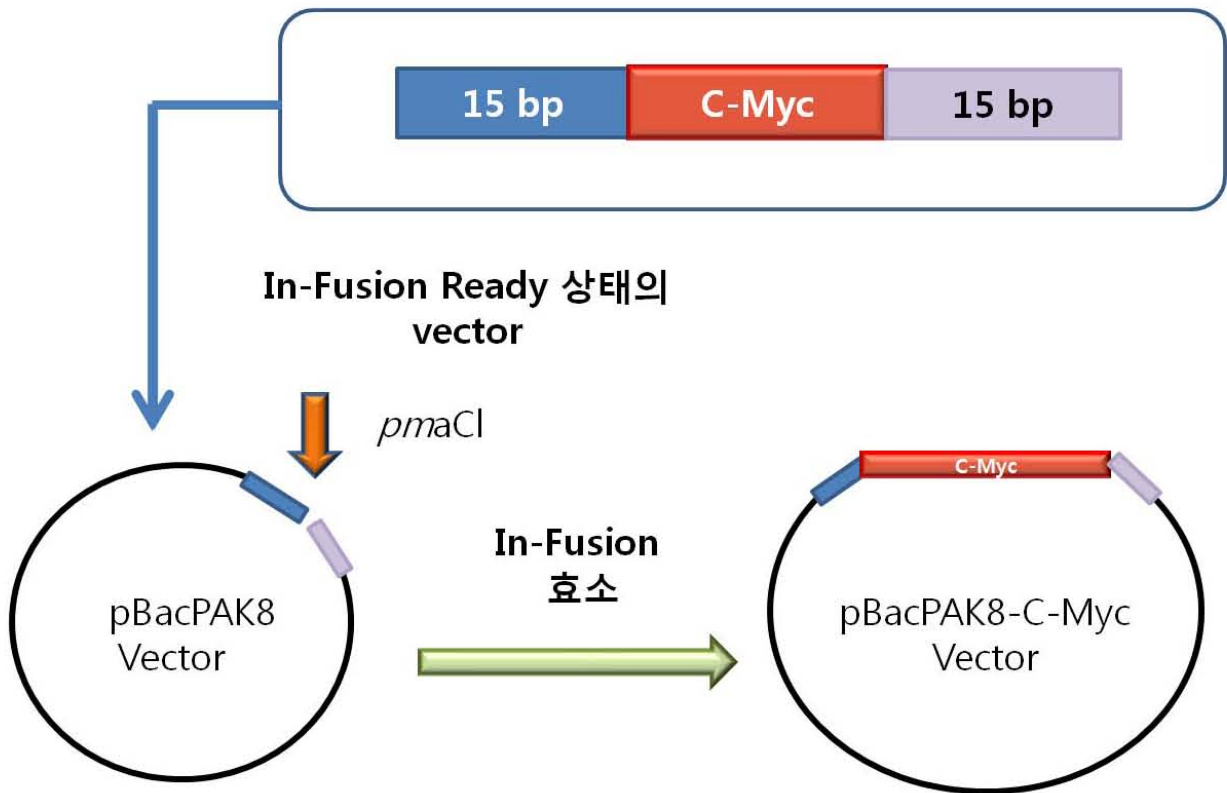


그림 17-14. BacPAK Baculovirus 발현시스템을 이용하기 위한 BacPAK8 벡터의 디자인.

3. 초대배양 일벌세포의 c-Myc 유전자 도입

가. 초대배양 방법

제주대학교 내에 있는 양봉장에서 유충을 채집하여 실험을 하였다. 벌집(honey comb)의 이상 유무를 육안으로 확인한 뒤 4x4 cm 크기로 잘라내었다. 살아있는 유충 6마리를 꺼내어 70% 알콜에 소독하였다. 소독이 완료된 유충을 배지에 넣은 후 가위로 수차례 mincing하여 유충의 조각이 1mm³ 이하가 되도록 하였다. 유충의 mincing액을 15 ml 튜브에 넣은 후 3분간 정치시켜 조직 절편이 가라앉기를 기다렸다가 상층액과 유충의 절편을 분리 하였다. 부유형 세포를 배양하기 위하여 상층액을 160 x g로 3분 동안 원심분리를 하여 상층액을 버린 후 침전을 다시 부유시킨 후 배양을 하였다. 부착형 세포를 배양하기 위하여 수거된 애벌레의 절편을 세포배양용 접시에 넣고 커버 글라스를 이용하여 바닥에 압착시켰다. 배양에 이용된 기본 R-배지를 사용하였다.

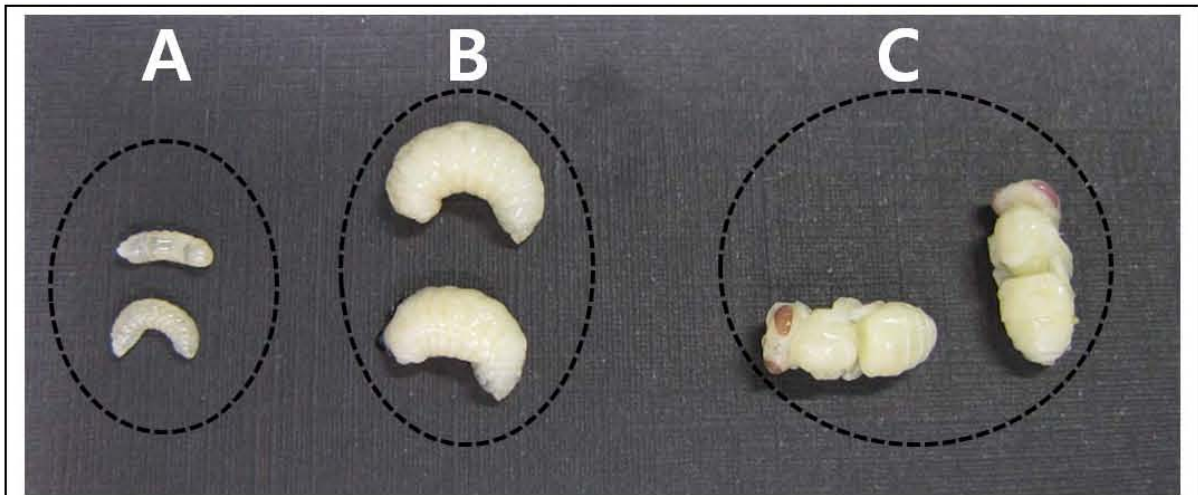


그림 17-15. 실험에 사용된 유충은 크기를 기준으로 하여 4~5일령(A)을 사용하였다.

유충의 크기를 비교하기 위한 사진으로 실제 사용된 유충의 사진은 아니다.

표 17-3. 초대배양 조건에 따른 계대가능 세대수와 세포의 지속기간

	일령	초대배양 조건		세대수	최대 배양기간 (일)
		세포 분리 방법	배양 배지		
일벌	4~5일령	소화효소 분리법 ¹⁾	일반 배지	12	54
			로알젤리 배지 ²⁾	14	62
			애벌레 체액 배지 ³⁾	12	72
		압착법 ⁴⁾	일반 배지	16	68
			로알젤리 배지	15	75
			애벌레 체액 배지	19	92
	6~8일령	소화효소 분리법	일반 배지	8	45
		압착법	일반 배지	10	52
번데기	소화효소 분리법	일반 배지	5	25	
수벌	4~5일령	소화효소 분리법	일반 배지	4	26
여왕벌	4~5일령	소화효소 분리법	일반 배지	13	62
	6~8일령	소화효소 분리법	일반 배지	9	59

1) collagenase와 dispase를 사용하여 조직절편에서 단일세포를 분리하는 방법

2) Grace's insect medium에 10% FBS, 0.01% antibiotics, lactalbumin, yeastolate 그리고 로알젤리 상층액을 첨가한 배지

3) Grace's insect medium에 10% FBS, 0.01% antibiotics, lactalbumin, yeastolate 그리고 애벌레 체액을 첨가한 배지

4) 소화 효소의 사용 없이 조직 절편을 배양 용기에 넣을 후 커머글라스로 눌러서 배양하는 방법

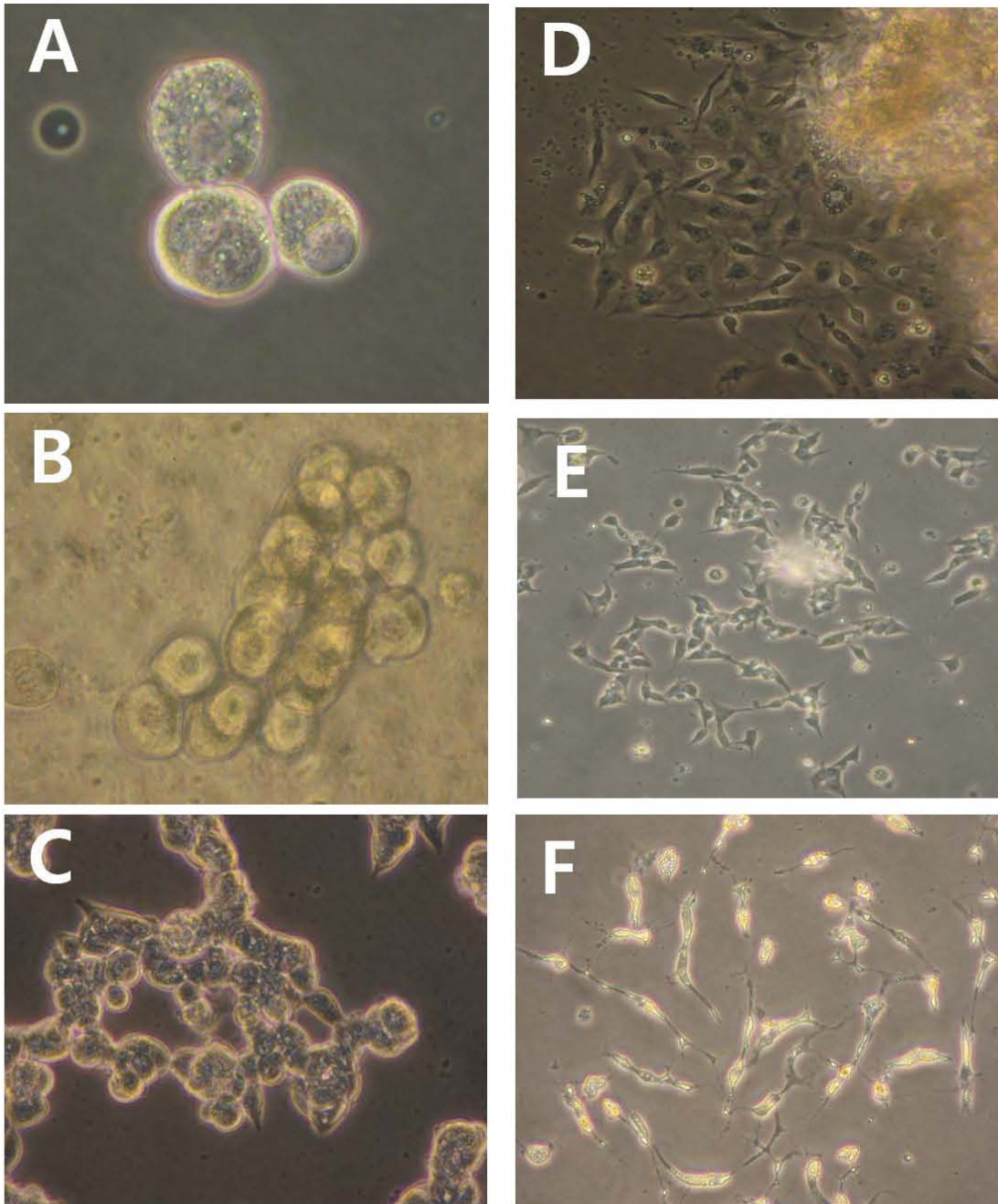


그림 17-16. 부유세포(A, B, C)와 부착세포(D, E, F)의 초대배양 모습.
 A: 부유세포의 초기 모습. B: 계대배양 후 모습. C: 사멸하고 있는 부유 세포의 모습. D: 부착세포의 초기 모습으로 조직 절편에서 부착세포가 분열되어 나오고 있다. E: 계대배양 후 모습. F: 사멸되고 있는 부착세포의 모습.

나. 초대배양 세포의 유전자 도입

부착형 세포와 부유형 세포로 크로닝 후 c-Myc 유전자를 도입시켰다. c-Myc는 세포의 증식자극에 의해 일괄적으로 발현이 상승하는 것으로 알려져 있는 핵내 DNA결합단백질을 코딩하는 암유전자의 하나로 각종 암세포에서 유전자 증폭을 나타낸다.

c-Myc 유전자 도입을 위하여 pFLAG-Myc-CMV와 BacPAK6-Myc 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터를 세포내로 도입하기 위하여 calcium phosphate transfection method를 이용하였다.

다. 에벌레 체액과 sf-21 세포배양액을 첨가한 배지의 제작

세포가 분열하기 위한 미지의 물질을 제공하기 위하여 에벌레 체액을 첨가한 배지(L-배지)와 sf-21 세포의 배양액을 첨가한 배지(SF-배지)를 제작하였다. L-배지의 제작을 위하여 살아있는 27마리의 꿀벌 유충을 70% 알콜에 소독하였다. 소독이 완료된 유충을 Grace's insect medium에 3번 세척을 하였다.

세척이 완료된 유충을 배지에 넣은 후 가위로 수차례 자르고 압착하여 체액이 나오도록 하였다. 1.5 ml 마이크로 튜브로 옮긴 후 3000 x g로 3분 동안 원심분리를 하고 상부에 부유하고 있는 지방질을 제거 하였다. 지방이 제거된 상층액을 수거하여 -20℃에 넣어 보관하고 실험에 사용 하였다.

SF-배지를 제작하기 위하여 sf-21 세포를 일반 배지에서 4일간 배양한 후 배지를 수거하였다. sf-21 세포와 죽은 세포의 찌꺼기를 제거하기 위하여 3000 x g로 3분 동안 원심분리를 하고 상층액을 수거하였다. 최종적으로 R-배지에 에벌레 체액을 30% 첨가한 RL30-배지와 sf-21 배양액을 50% 첨가한 RSF50-배지를 제작하고 각각의 배지를 이용하여 c-Myc이 도입된 세포주를 배양하였다.

라. 유전자 도입 결과

c-Myc 유전자 도입 후 일반 배지에 로얄젤리를 첨가한 R-배지와 에벌레 체액을 30% 첨가한 RL30-배지 그리고 sf-21 배양액을 50% 첨가한 RSF50-배지를 이용하여 배양한 결과 세포의 증가나 사멸 속도에 유의한 결과를 보이지는 않았다. 또한 c-Myc 유전자 도입 후 세포수의 증가도 관찰되지 않았다. 하지만 c-Myc 유전자 도입 후 부유세포의 경우 14세대 이상 계속하여 생존하는 것을 관찰할 수 있었다.

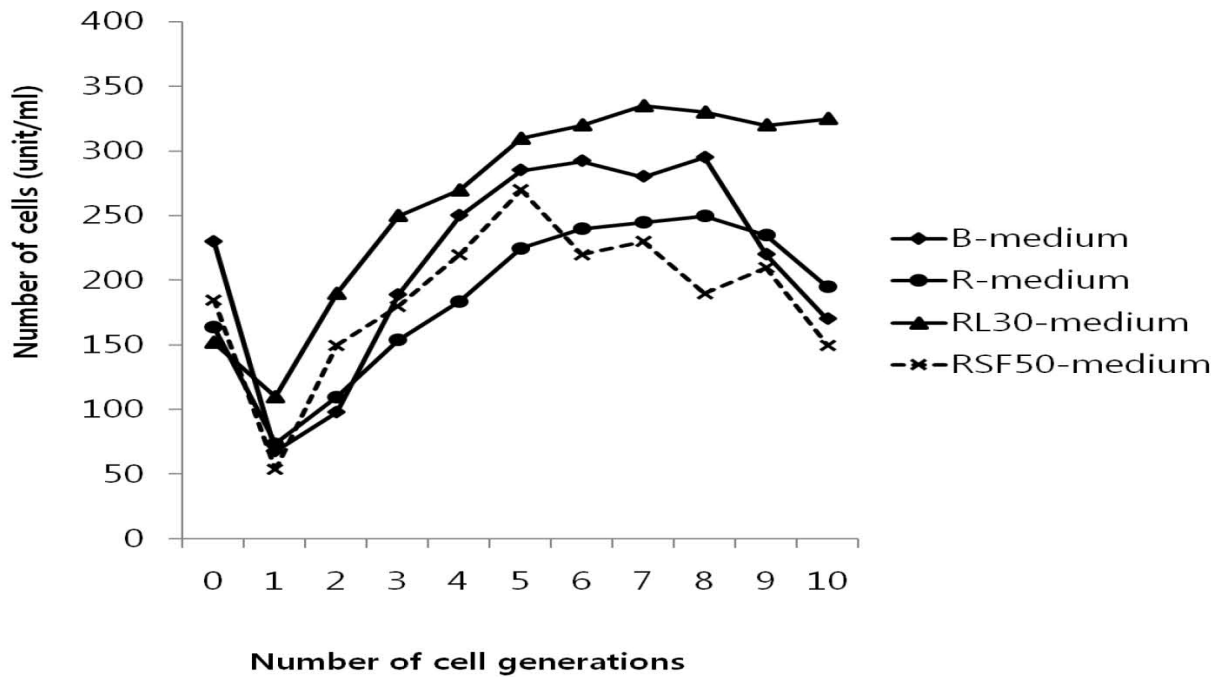


그림 17-17. 부착형 세포에 c-Myc 유전자를 도입하고 배지의 구성에 따른 세포의 증식 정도.

애벌레 체액이 포함된 RL30-medium을 이용하여 배양한 결과 초기 유전자 도입에 따른 세포의 사멸이 가장 적었으며 유전자 도입 7세대에서 처음보다 약 2.5배 정도 세포가 증가하였다.

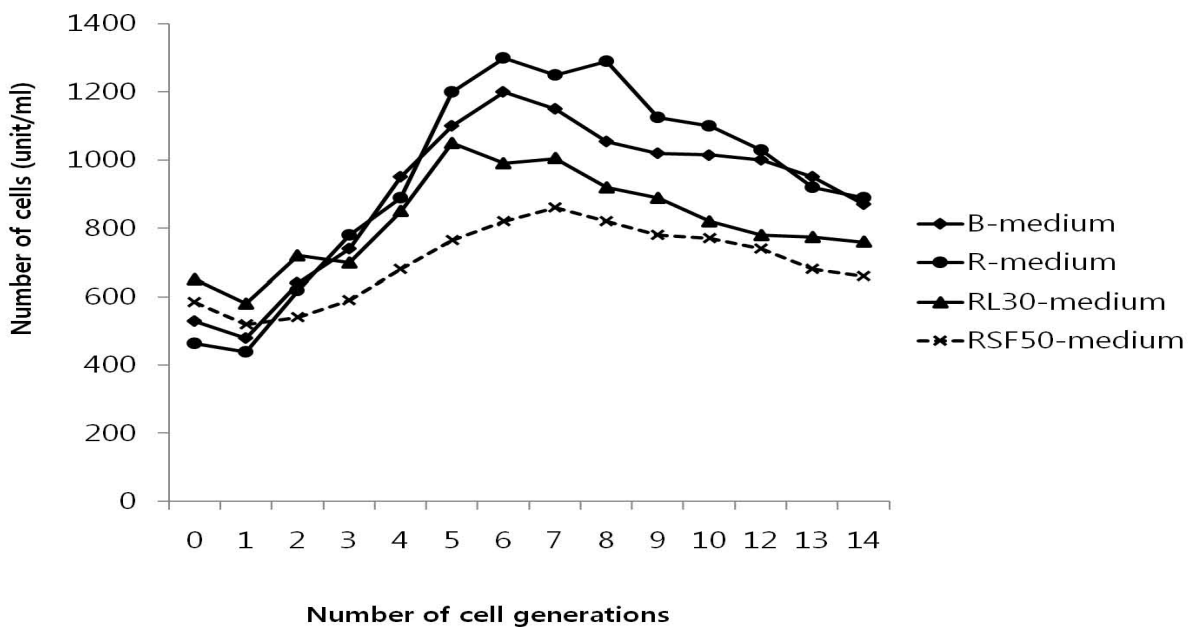


그림 17-18. 부유세포에 c-Myc 유전자를 도입하고 배지의 구성에 따른 세포의 증식 정도.

로얄젤리만 첨가된 R-medium을 이용하여 배양한 결과 유전자 도입 6세대에서 처음보다 약 3배 정도 세포가 증가하였다. 로얄젤리와 sf-21 배양액이 첨가된 RSF50-medium으로 배양한 결과 유전자 도입 7세대에 처음보다 약 1.5배 정도 세포가 증가하여 가장 낮았다.

C-Myc 발현 확인을 위한 PCR

C-Myc 유전자 도입



세포 배양 → 계대 6회(유전자 도입 후 5일, 10일, 15일, 20일, 25일, 30일)



DNA 추출 ← E-spin™ DNA Extraction Kit



PCR

PCR primer 및 반응 조건		
	Sequence	Amplicon size
Forward Primer	ATGTTCAAACTATATCCCCT	164
Reverse Primer	CTATCATGAGTCATTCTCTGTA	
PCR 조건		
95℃, 2 min : Pre-denaturation		1 cycle
95℃, 30 sec : Denaturation		45 cycle
58℃, 30 sec : Annealing		
72℃, 1 min : Extension		
72℃, 5 min : Post-extension		1 cycle
30℃, 3 min hold		

그림 17-19. C-Myc 발현 확인을 위한 PCR 디자인.

c-Myc 유전자가 도입이 된 세포의 시간에 따른 c-Myc 유전자의 발현을 비교하여 보았다. c-Myc 유전자 도입 후 5일부터 20일까지는 유전자가 발현되고 있음을 확인 할 수 있었다. 하지만 유전자 도입 25일 후 부터는 유전자가 발현되지 않는 것이 확인되었다.

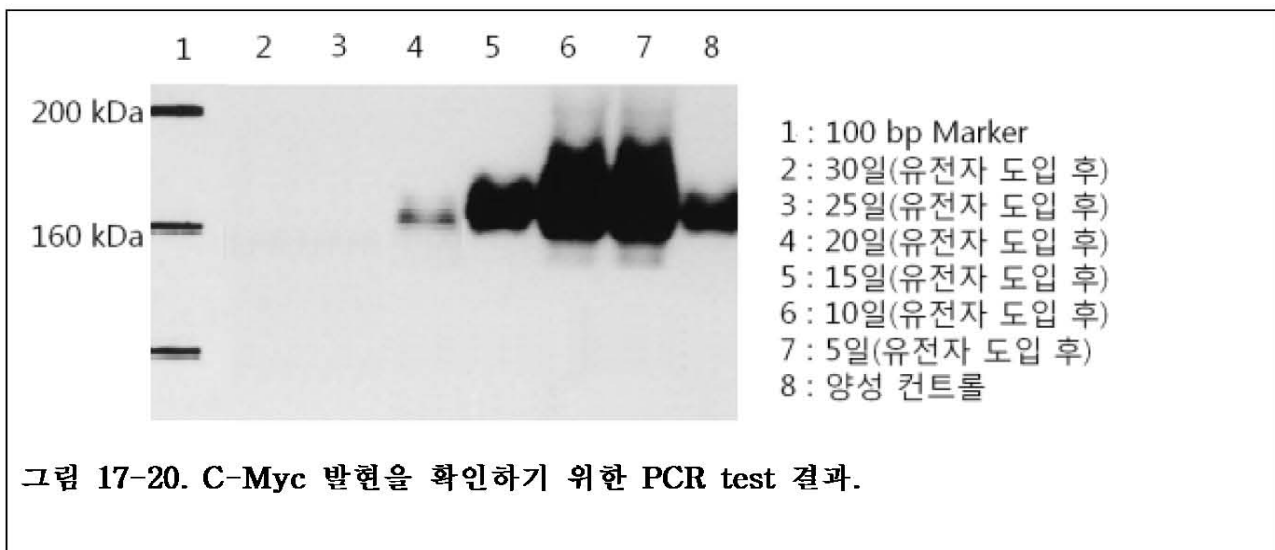


그림 17-20. C-Myc 발현을 확인하기 위한 PCR test 결과.

4. 여왕벌 애벌레의 세포배양

꿀벌의 개체는 여왕벌과 수벌 그리고 일벌로 나뉜다. 일벌은 모두 암컷으로 꿀과 꽃가루의 채집, 집짓기와 집수리, 여왕벌이 산란한 알의 관리 등 꿀벌군집에서 대부분을 차지하고 있다. 수벌은 일벌이 산란한 개체로 반수체이며 주요 임무는 혼인비행을 통하여 여왕벌에게 정자를 전달하는 것이다. 여왕벌의 임무는 일생을 통하여 알을 낳아 군체를 유지하는 것이다. 꿀벌의 수명은 여왕벌이 가장 길고 수벌이 가장 짧다. 일벌은 계절에 따라 수명이 다르다고 알려져 있다. 개체마다 차이가 있으나 일반적으로 여름철에는 6~8주, 겨울철에는 길게는 7~9개월 정도로 알려져 있다. 일벌과 다르게 주요 임무가 산란인 여왕벌의 수명은 매우 길다. 여왕벌의 수명은 3~4년으로 알려져 있다. 이렇게 여왕벌의 수명이 긴 것은 여왕벌의 먹이에 기인을 하고 있다고 여겨지고 있다.

여왕벌의 주식인 로얄젤리는 일벌이 분비하는 물질로 주요 성분으로는 단백질이 20~30 %, 탄수화물 15 %, 지방 10~15 %, 수분 50~60 %를 함유하고 있으며, 미네랄 및 비타민을 많이 함유하고 있다. 여왕벌이 될 애벌레는 왕대 속에서 일반 일벌의 애벌레보다 긴 기간 동안 더 많은 로얄젤리를 섭취하게 된다. 즉, 같은 애벌레라도 로얄젤리는 섭취하는 기간과 양에 따라서 일벌 혹은 여왕벌이 되는 것이다. 앞서 실험을 한 결과에도 로얄젤리를 첨가한 배지에서 자란 일벌세포가 일반 배지에서 자란 일벌세포보다 더 오래 생존함을 확인하였다. 따라서 왕대에 있는 여왕벌이 될 애벌레를 로얄젤리가 함유된 배지를 이용하여 배양하면 보다 오랜기간 동안 꿀벌세포를 배양할 수 있을 것이라 사료가 된다.

가. 여왕벌 애벌레의 채집

대량의 여왕벌 애벌레를 얻기 위하여 인공적으로 왕대를 설치하였다. 설치된 왕대에서 성공적으로 부화가 이루어져 왕대의 입구가 봉해진 것을 실험실로 운반하였다. 왕대를 70% 알콜에 침전시킨 후 완전히 건조를 시켜 살균을 하였다. 멸균된 수술용 가위를 사용하여 밀랍을 조심스럽게 제거하였다. 애벌레의 일령을 확인하고 아스피레이터를 사용하여 애벌레를 벌방에서 꺼냈다. 애벌레를 70% 알콜에 침전시켜 표피를 살균한 후 10% FBS가 첨가된 Grace's insect medium으로 세척을 하여 잔존하는 알콜을 모두 제거하였다.

나. 여왕벌 애벌레의 세포의 배양

배양에 사용된 배지의 제작은 다음과 같이 이루어졌다. 여왕벌 애벌레 배양용 배지는 Grace's insect medium에 10% FBS, 0.01% antibiotics (1×10^4 units/ml of penicillin, 1×10^4 units/ml of streptomycin), lactalbumin, yeastolate를 첨가하여 만들었다. 로얄젤리 상층액을 얻기 위하여 Grace's insect medium 50 ml에 로얄젤리 50 g을 첨가한 후 4°C에서 30분간 교반을 하였다. 교반을 한 배지를 $3,000 \times g$ 로 15분간 원심분리 하여서 상층액을 수거하고 0.01%의 antibiotics를 첨가하였다.

부착하는 세포를 얻기 위하여 10% FBS와 0.01% antibiotics를 첨가한 Grace's insect medium에 유충을 넣은 후 1 mm³ 이하가 되도록 가위로 수차례 mincing하였다. 20%의 로얄젤리 상층액과 30% FBS 그리고 0.01% antibiotics가 첨가된 Grace's insect medium을 세포배양용 페트리디쉬에 12 ml 넣은 후 mincing된 애벌레 조직을 넓게 분포시켰다. 멸균된 슬라이드 글라스를 조직위에 올려놓고 28℃에서 압착법을 이용하여 세포를 배양하였다. 배양 48시간이 지나면 aspirator를 이용하여 매우 천천히 배지를 제거하였다. 배지가 제거 되면 새로운 20%의 로얄젤리 상층액과 10% FBS 그리고 0.01% antibiotics가 첨가된 Grace's insect medium 배지를 첨가하여 24시간 동안 배양을 하였다. 24시간 마다 현미경으로 세포를 관찰하고 충분히 세포가 부착이 되었으면 커버글라스를 제거하였다.

부유하는 세포를 얻기 위하여 mincing된 여왕벌 애벌레의 조직을 50 ml conical tube에 옮긴 후 5 ml의 Grace's insect medium을 첨가하여 20~30회 전동피펫으로 피펫팅을 하였다. 10 ml의 Grace's insect medium을 첨가하고 1~2분 정치시켜 소편을 가라앉히고 상층액을 수거하였다. 조직소편이 제거된 상층액을 50 ml conical tube 넣은 후 Grace's insect medium을 10 ml 첨가하고 피펫으로 다시 부유시킨 후 1~2분 정치하고 상층액을 수거하였다. 이와 같은 처리를 3~4회 반복하여 조직소편을 충분히 제거하였다. 지방성분 등으로 인하여 표면에 부유하는 조직은 aspirator로 흡수하여 제거하였다. 최종적으로 수거된 상층액을 160 × g로 3분 동안 원심분리 하여서 침전된 세포만을 수거한 후 10% FBS와 0.01% antibiotics를 첨가한 Grace's insect medium을 첨가하여 28℃에서 배양을 하였다.



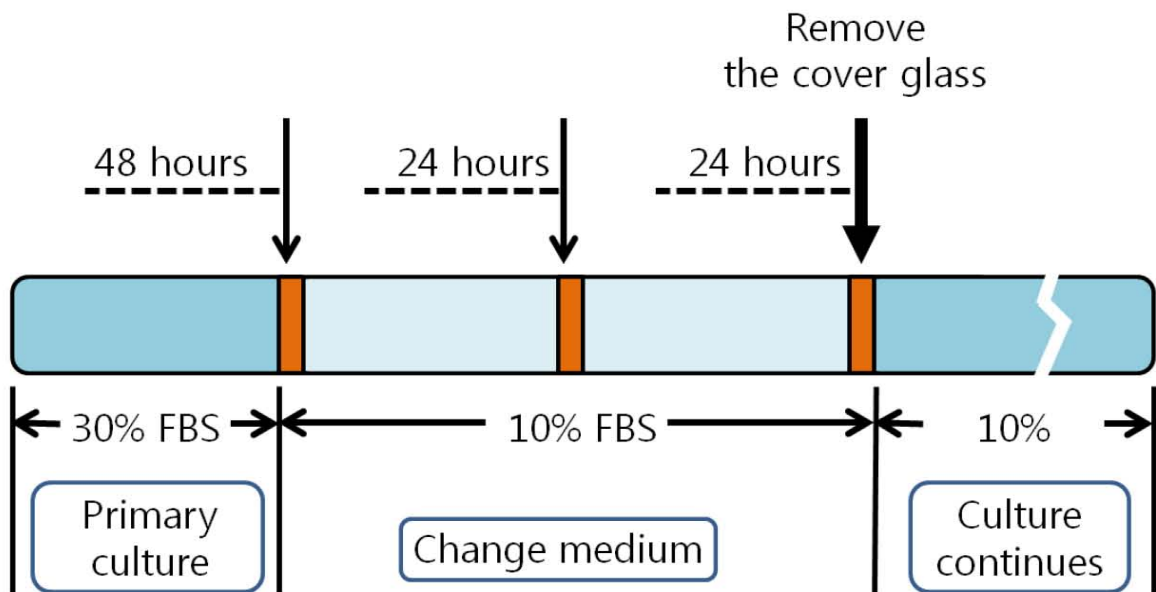


그림 17-22. 압착법으로 여왕벌 세포를 배양하기 위한 스케줄.

초대배양은 30% FBS가 첨가된 배지를 이용하고 배양 48시간이 지나면 10% FBS가 첨가된 배지로 교환하였다. 24시간마다 현미경으로 관찰하여 세포가 충분히 부착을 하였으면 커버글라스를 제거하였다.

다. 초대배양 세포의 크로닝

배양특성이 서로 다른 2가지 종류의 세포 group을 배양하였다. 압착법에 의하여 배양된 세포는 부착을 하여서 자라는 특성을 보였다. 전체적인 세포의 특성은 동물세포의 상피세포 혹은 섬유아세포와 유사한 모습과 특성을 나타내었다. 반면에 부유법으로 배양한 세포는 둥글고 구형의 세포로서 매우 큰 핵을 가지고 있었다.

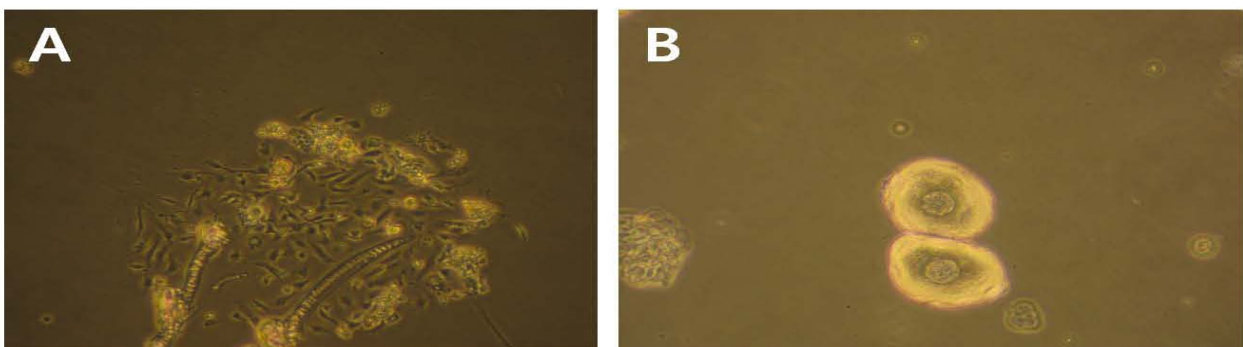


그림 17-23. 초대배양 세포의 현미경사진.

A: 압착법에 의하여 배양된 세포의 모습으로 압착을 위한 커버글라스를 제거한 상태이다 (부착하는 세포의 특징을 가지고 있다), B: 부유법으로 배양된 세포의 모습(바닥에 가라앉지만 부착하지는 않는다).

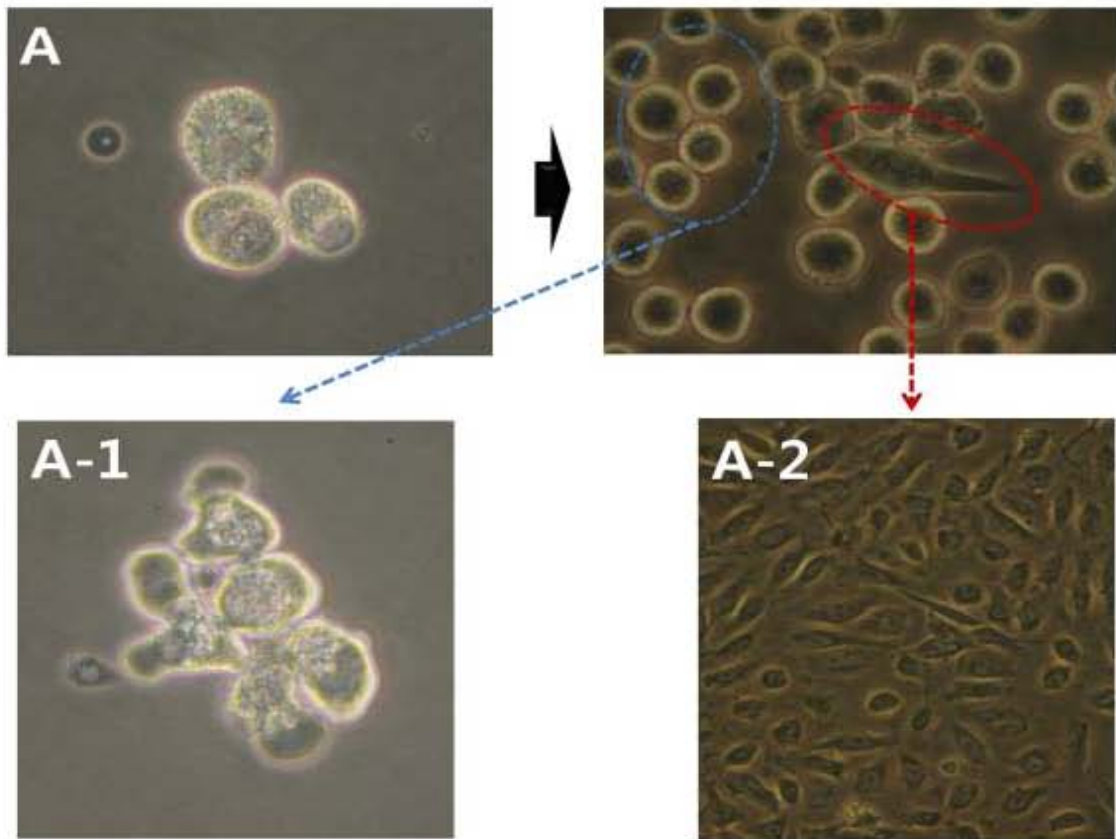
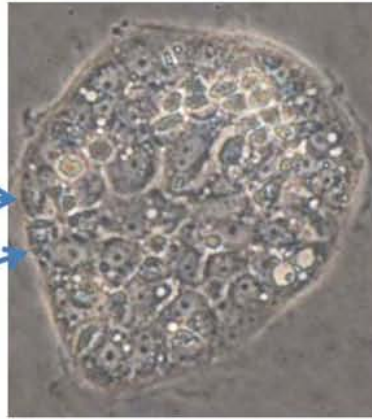


그림 17-24. 부유법으로 배양된 세포에서 부착형 세포의 발생.

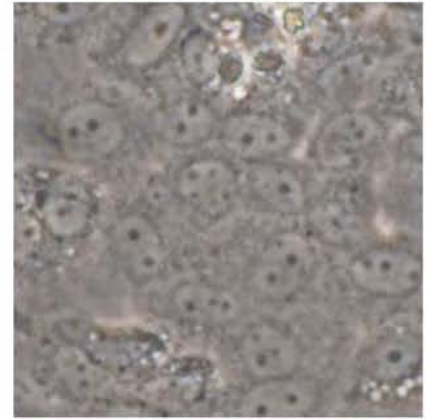
A: 부착하지 않고 부유하는 세포, A-1: 분열이후에도 계속하여 부착하지 않는 세포, A-2: 부유하는 세포 중에서 일부분이 울쟁이 모양의 부착형 세포로 분화할 하였다.



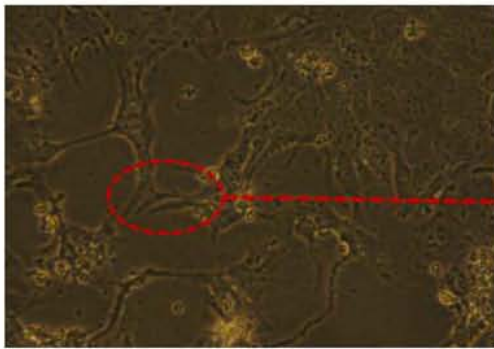
B세포 : 1세대



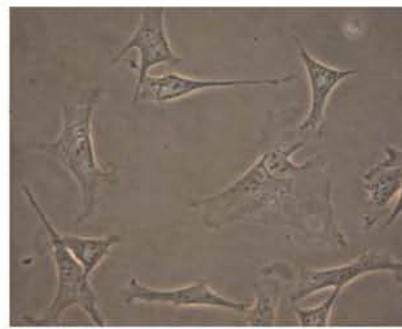
B세포 : 10일



B-1세포 : 21일



B세포 : 21일



B-2세포

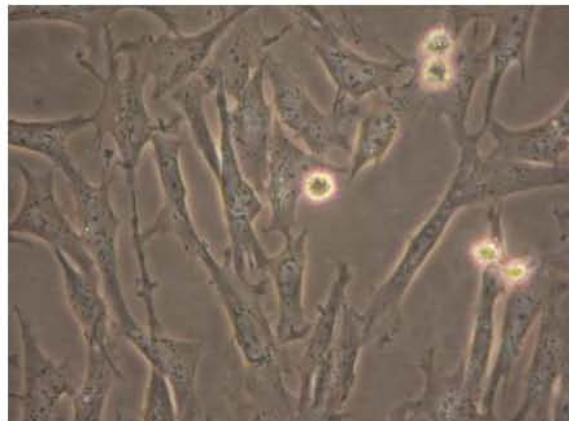


그림 17-25. 암착법으로 배양된 세포에서 부착형 세포의 발생.

5. 레트로바이러스 벡터를 이용한 골별세포의 불멸화

레트로바이러스 벡터는 그 특성 때문에 세포의 불멸화를 위한 벡터로 자주 이용이 되고 있다. 레트로바이러스는 (retrovirus)는 역전사효소(reverse transcriptase)를 가지고 있어 RNA로부터 DNA가 합성되는 과정인 역전사(reversetranscription)가 일어난다. 이로써 유전정보의 흐름이 DNA에서 RNA로 되는 일반적인 방향과 반대인 RNA에서 DNA로 흐르는 과정이 첨가된다. 이러한 레트로바이러스는 유전 물질인 RNA가 동일한 가닥으로 두 개 있고, 두 분자의 역전사효소, 캡시드, 바이러스 피막으로 구성되어 있다. 캡시드(capsid)는 바이러스 유전물질인 RNA를 둘러싸고 있는 단백질 껍질이다. 바이러스 피막은 캡시드를 둘러싸고 있는 막으로, 피막에 있는 당단백질은 레트로바이러스가 특정 숙주세포의 수용체에 결합하게 하여 숙주세포를 감염시킬 때 필요한 보조기구로 작용한다.

가. 레트로바이러스의 감염 과정

레트로바이러스가 숙주세포 안으로 들어온 후, 역전사효소는 숙주세포 내에서 바이러스 RNA에 상보적인 한 가닥의 바이러스 DNA를 합성한다. 이어서 RNA는 분해되고 상보 가닥인 DNA 가닥이 합성되어 새로운 이중나선 DNA가 된다. 이것을 프로바이러스(provirus)라고 하며, 숙주세포의 핵으로 들어가 염색체 DNA에 삽입되어 숙주세포를 떠나지 않으면서 계속 세포 내에 남게 된다. 이와 같이 자신의 DNA를 숙주세포에 삽입하는 기능은 원하는 유전자를 세포에 영구히 도입하기 위하여 매우 중요한 부분이다.

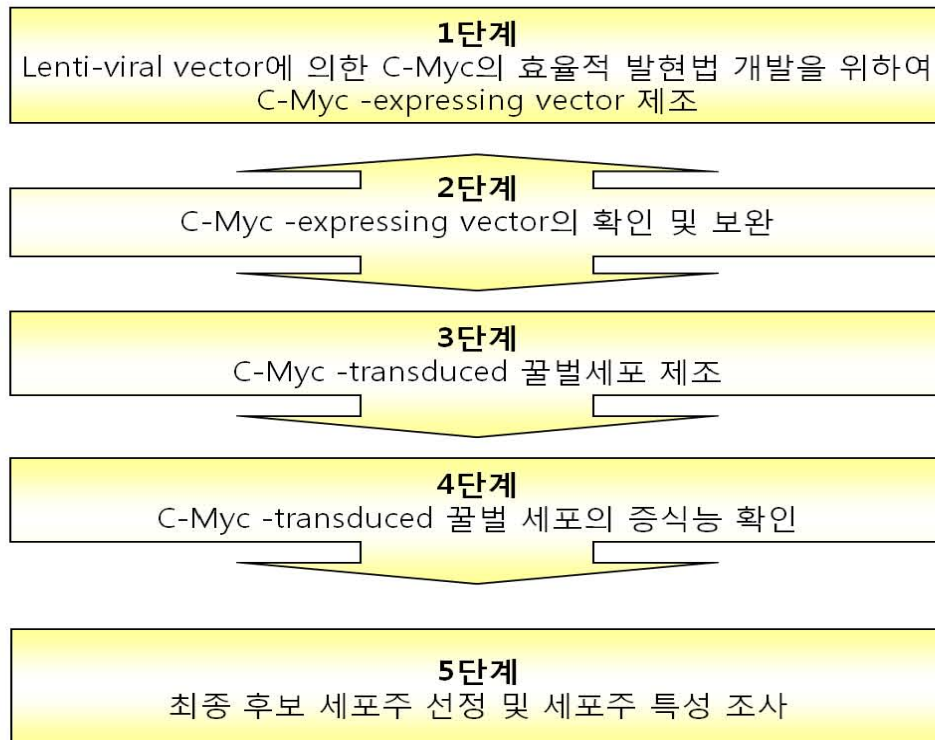


그림 17-26. 레트로바이러스 벡터를 이용한 꿀벌세포의 불멸화를 위한 단계도

일반적으로 초대배양세포는 유효계대수가 짧아 항원생산에 오래 사용하기가 어려울 뿐 아니라 초저온 동결 후 해동 시에 그 특성이 변화한다. 초대배양세포의 가장 큰 장점 중 하나는 암조직으로부터 제작된 세포주 또는 암화된 세포주와 달리 각 장기의 세포가 가지고 있는 생리학적인 특성을 그대로 간직하고 있다는 점이다. 각종 동물에서 초대배양 방법은 많은 연구가 되어 있으나 동물의 태아를 이용한 연구는 미진한 실정이다. 태아를 이용할 경우 분열기에 있는 세포가 풍부하여 초대배양 시에 오랜 기간 세포가 생존하고 분열속도도 왕성한 장점을 지니고 있다. 초대배양 시에 사용하는 많은 효소들 가운데 collagenase와 dispase는 trypsin과 달리 세포독성이 적어서 장시간 동안 조직이나 세포에 적용이 가능하고 세포간의 연결을 효과적으로 절단 할 수 있으며 농도와 처리시간을 잘 조정하면 상피세포만을 분리 할 수 있어 초대배양 세포에서 섬유아세포의 혼입을 최소화 할 수 있다).

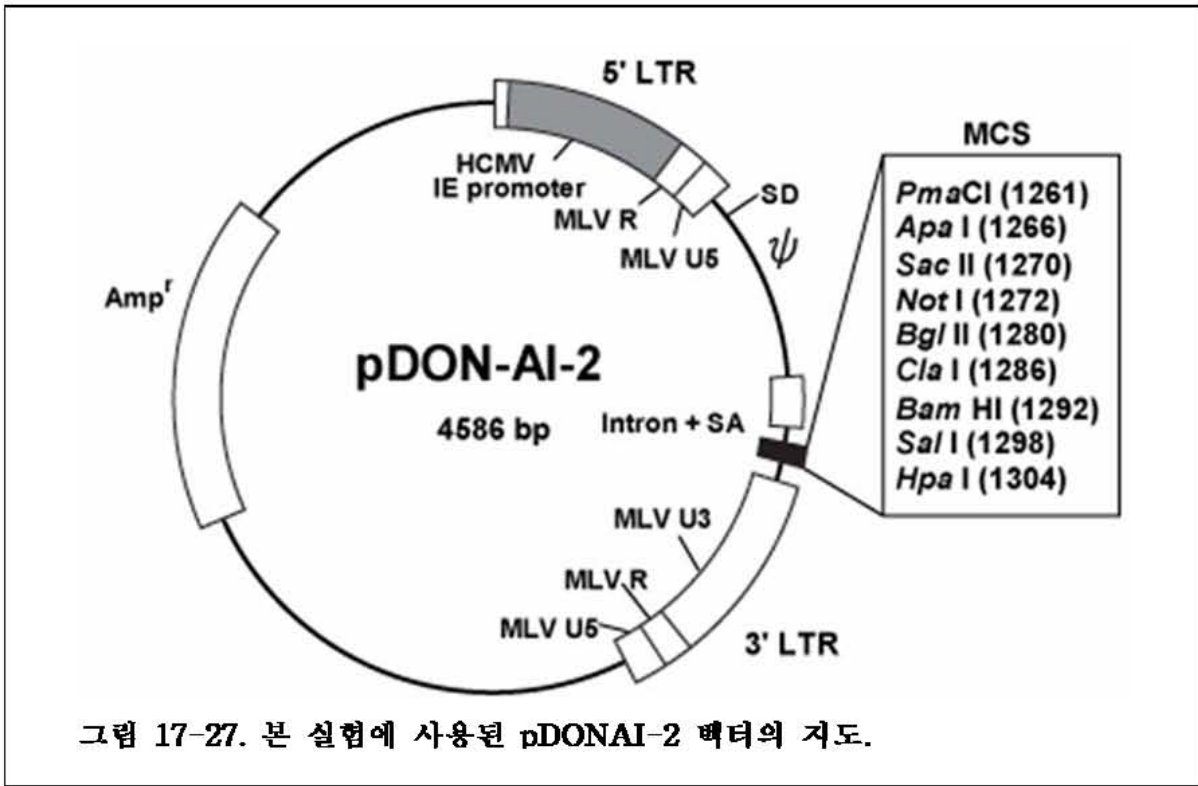
또한 초대 배양 시 red blood cell (RBC)가 다량 포함되어 있으면 RBC가 세포의 부착을 저해하게 된다. 상피세포의 배양에 있어서 가장 문제가 되는 것 중 하나가 섬유아세포의 혼입이라 할 수 있다. 섬유아세포는 상피세포보다 세포간의 결합력이 강하고 상피세포보다 분열이 빠른 특성을 가지고 있다. 이러한 특성 때문에 상피세포와 섬유아세포가 함께 자라고 있으면 계대수가 늘어나면서 상피 세포의 비율은 점점 줄어들고 섬유아세포의 비율은 점점 늘어나는 섬유아세포 우점현상이 발생하고 이러한 우점 현상에 의하여 상피세포들은 대부분 조기에 사멸하게 된다.

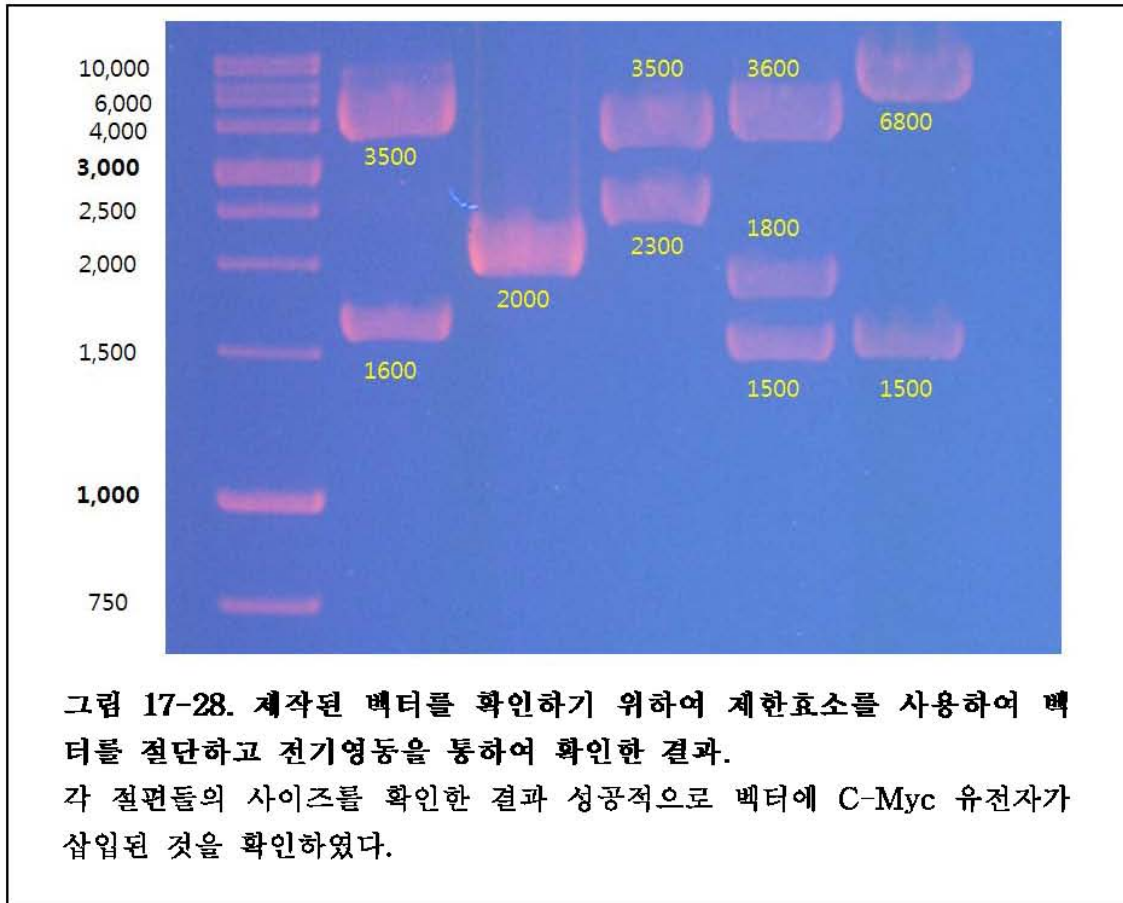
초대배양 시에 가장 문제가 되는 섬유아세포의 제거를 위하여 edetate disodium dihydrate (Na₂EDDA)를 이용하는 방법이 연구되었는데, Na₂EDDA는 섬유아세포의 세포간 결합의 가장 큰 비중을 차지하는 Ca²⁺결합 사이에 들어가서 섬유아세포들 간의 결합을 효과적으로 저해할 수 있다. 물론 상피세포 또한 Ca²⁺결합을 가지고 있지만 섬유아세포에 비하여 그 비율이 낮으므로 Ca²⁺의 결합만을 제거해 주면 섬유아세포의 박리가 먼저 일어나게 된다. 이러한 섬유아세포와 상피세포간의 박리가 이루어지는 시간적 차이를 이용하면 효과적으로 섬유아세포와 상피세포를 분리할 수 있다. 또한 상피세포와 섬유아세포가 초대배양 시 배양 용기에 붙기 위해 필요한 부착인자의 양에도 차이가 있다. 섬유아세포는 상피세포에 비해 초기 배양 용기에 부착을 위해 더 많은 fetal bovine serum (FBS)을 필요로 하지만 상피세포는 적은 양의 FBS 만으로도 충분히 부착이 가능하다. 이러한 세포종류에 따른 특성을 이용하면 효과적으로 섬유아세포를 제거할 수 있다.

이를 위하여 초대배양 세포주에 C-Myc를 발현하는 레트로 바이러스 입자를 삽입하여 골별 세포의 불멸화를 시도하였다. 또한, 불멸화된 세포주에 재조합 레트로 바이러스 입자를 삽입하여 동시에 재조합 단백질을 지속적으로 생산할 수 있는 세포주의 개발을 수행하였다.

나. 레트로 바이러스 벡터 제작과정

재조합 단백질을 발현할 수 있는 재조합 레트로 바이러스 벡터를 제작하였다. C-Myc 유전자를 복제하기 위한 primer는 벡터와 각 유전자가 앞과 뒤로 15 bp가 겹치도록 디자인 하였다. C-Myc 을 PCR로 합성하기 위하여 5' GGG GTC AAA ATT CGC CCA CGC TAT GCC GCC AGC 3'과 5' ATT ATG ATT ATG CTC GAG AAT AGC CGG CGC 3' primer를 사용하였다. TAKARA사(Japan)의 Long PCR 방법으로 복제를 하고 In-fusion 효소를 이용하여 pmaC I으로 절단된 pDONAI-2 벡터에 삽입하여 pDONAI-2-C-Myc 벡터를 제작하였다.

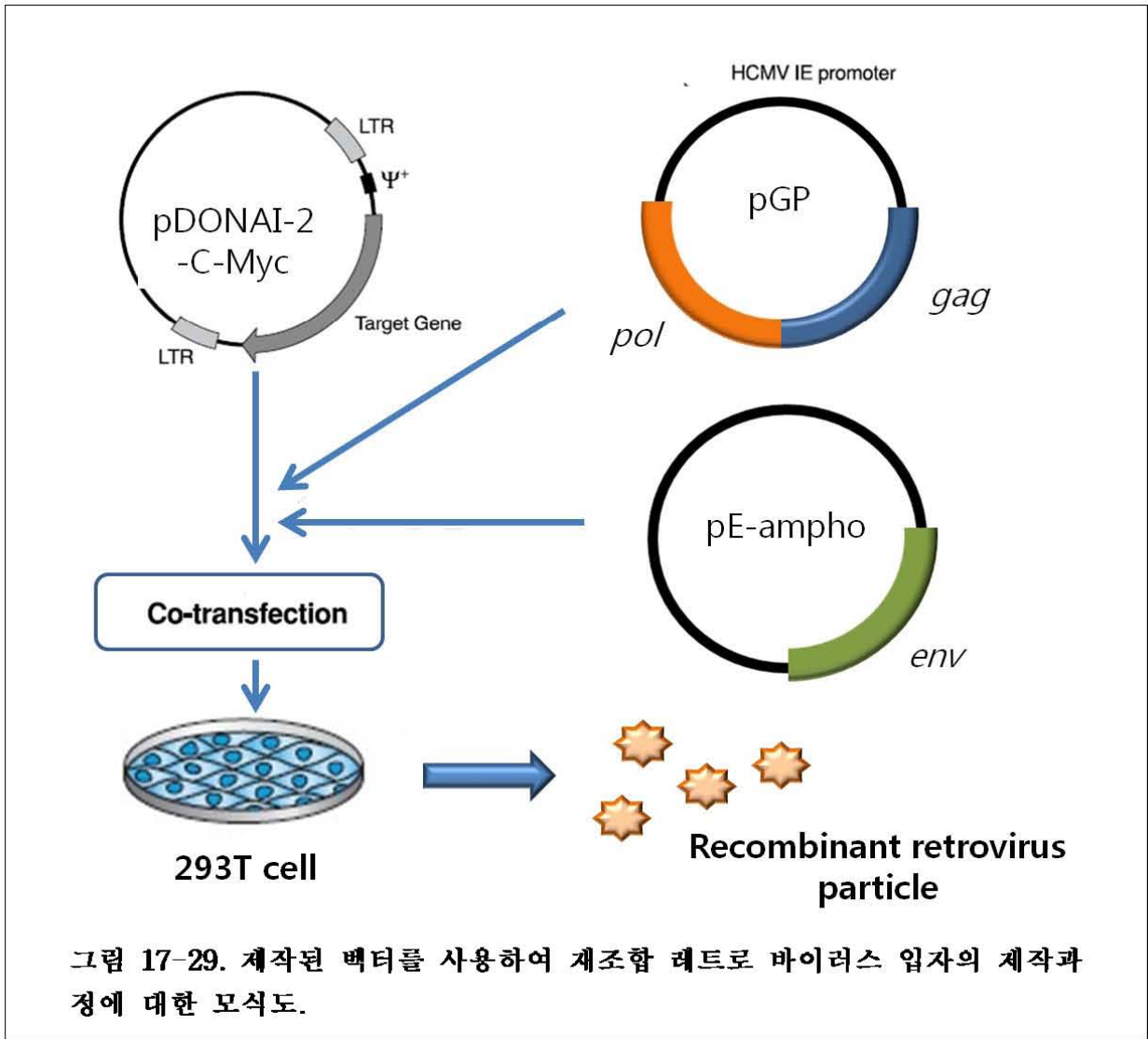




다. 제조함 레트로 바이러스 입자의 제작

안정적으로 세포내로 유전자를 도입시키기 위하여 사용할 레트로바이러스 입자를 Retrovirus Packing System (TAKARA Bio, Japan)을 이용하여 co-transfection방법을 통하여 제작하였다.

293T cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. Co-transfection 후 7~11시간동안 5% CO₂, 37°C에서 처리한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 회수하고 0.45 μm filter를 사용하여 여과 후 -80°C에 보관하며 transduction에 사용하였다.



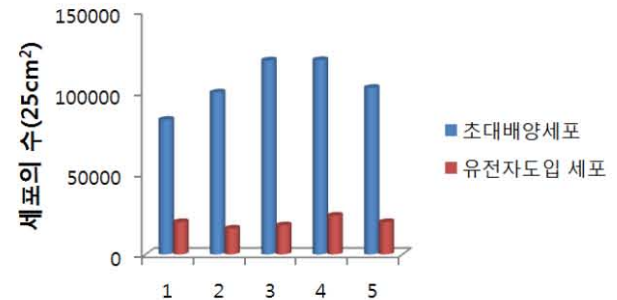
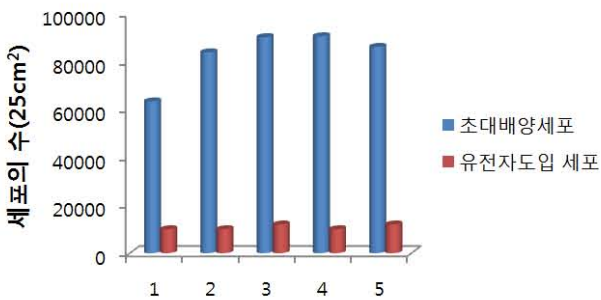
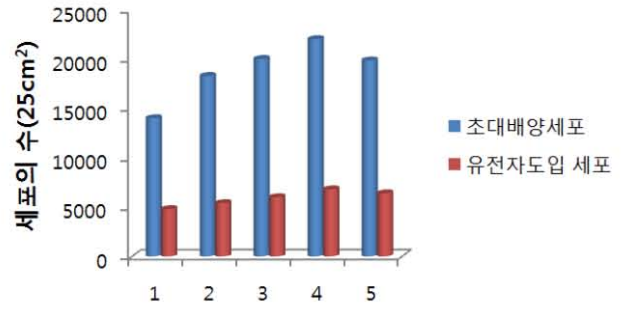
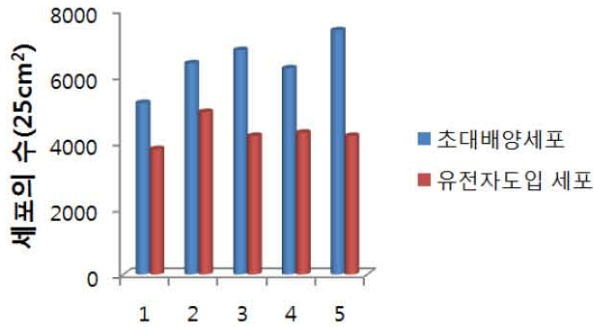


그림 17-30. 부유 세포주에 재조합 레트로바이러스 입자를 접종 후 배양된 세포의 수. 접종 MOI와 세대수에 따른 세포의 수. 상좌로부터 제대배양 2, 3, 4, 5 세대

라. 유전자 도입과 세포의 크로닝

T25 cell culture flask에 3×10^4 개의 초대배양세포를 넣은 후에 배지을 5 ml 첨가하여 28°C, incubator에서 48시간 배양 하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고 세포세척용 PBS로 3회 세척을 하였다. 세척된 세포에 재조합 레트로바이러스 입자를 multiplication of infection (MOI) 5가 되도록 1ml 접종을 하였다. 재조합 바이러스가 접종된 세포는 28°C, incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 접종배양 4시간 후에 4 ml의 배지을 첨가하고 27°C, incubator에서 72 시간 동안 배양 하였다.유전자 도입 이후 단일세포로 cloning을 하고 세포의 형태와 크기를 고려하여 2개의 세포주를 선별하였다. 96-well cell culture plate에서 single cell cloning을 수행 하여 세포주를 선별하였다.

마. 세포의 암세포화 확인 실험

풀벌세포가 암세포화가 되었는지 알아보기 위하여 염색체 검사를 수행하였다. 암세포화를 확인하기 위한 여러 가지 직-간접적인 방법이 있지만 염색체를 검사하는 방법은 대표적인 직접적인 확인 방법이다.

C-Myc 유전자가 도입된 꿀벌 세포의 유사분열을 억제하기 위하여 72시간동안 배양한 세포에 colcemid(5 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하였다. 최적의 colcemid의 처리 용량과 처리 시간을 알아보기 위하여 T-25 cell culture flask에서 자라고 있는 세포에 0.5 ml와 1 ml 그리고 2 ml씩의 colcemid를 배지에 첨가한 후에 30분, 60분, 90분 그리고 120분 동안 배양을 하였다. 유사분열 억제를 위한 처리가 종료되면 세포세척용 PBS로 3번의 세척을 하고 세척된 침전물에 trypsin/EDTA 500 μl 를 첨가하고 3분 동안 처리하여 단일세포로 분리를 하였다.

160 × g로 3분 동안 원심분리를 하여 침전된 세포만을 수거하고, 세포를 팽창시키기 위하여 0.075 M의 KCl(저장액) 5 ml을 첨가하였다. 저장액은 32°C로 중탕을 한 후 15분 동안 32°C 인큐베이터에서 처리를 하였다. 저장액 처리가 끝나면 원심분리 시 세포의 파괴를 최소화하기 위하여 고정액(methanol and acetic acid, 3 : 1) 200 μl 을 첨가하여 5분 동안 상온에서 예비고정을 하였다. 예비고정이 끝나면 160 × g로 3분 동안 원심분리를 하고 침전된 세포를 수거하였다. 1차 고정을 위하여 수거된 세포에 4°C로 냉각된 고정액을 500 μl 를 첨가하고 4°C에서 2시간 동안 처리하였다. 1차 고정이 끝나면 원심분리를 통하여 세포를 수거하고 200 μl 의 고정액을 첨가하여 4°C에서 24시간 반응을 시켜 2차 고정을 하였다. 고정이 완료된 세포는 냉장보관을 하였다.

고정이 끝나서 냉장보관중의 샘플을 사용하여 슬라이드를 제작하였다. 4°C로 냉각된 슬라이드 글라스에 고정이 완료된 세포 부유액을 1,000 μl 마이크로 피펫을 사용하여 1방울 떨어트렸다. 슬라이드에 세포 부유액이 떨어지는 높이에 의하여 최종적으로 제작되는 슬라이드상의 염색체 분포가 달라진다. 최적의 슬라이드 글라스와 마이크로피펫 사이의 거리를 알아보기 위하여 10 cm, 20 cm, 40 cm 그리고 60 cm의 다양한 높이에서 세포 부유액을 떨어트렸다. 또한 염색체의 흩어짐 정도는 기온과 습도에 따라서 차이가 난다. 염색체의 건조시간이 짧으면 염색체가 뭉치거나 접치게 되며, 건조시간이 너무 길어지면 염색체가 과도하게 흩어지게 되어 서로 다른 세포의 염색체가 서로 섞이게 된다. 최적의 건조 시간을 알아보기 위하여 공기 순환형 dry oven을 이용하여 40°C, 50°C, 60°C 그리고 70°C에서 4시간 동안 건조를 하였다. 건조가 완료되면 methylene blue(Sigma, USA)를 이용하여 염색체를 염색하고 현미경으로 관찰을 하였다.

바. 세포의 암세포화 확인 결과

유사분열 억제를 위한 최적의 colcemid의 처리 용량과 처리 시간을 알아보기 위하여 colcemid(5 $\mu\text{g/ml}$)를 0.5 ml와 1 ml 그리고 2 ml 씩 첨가한 후에 30분, 60분, 90분 그리고 120분 동안 처리하였다. Colcemid 0.5 ml를 첨가한 경우 모든 처리 시간에서 현미경으로 확인 할 수 있는 최대의 염색체의 발견 비율(정상적으로 뭉쳐진 상태의 핵과 풀어진 상태인 염색체의 비율)은 모든 처리 시간에서 1% 미만으로 나타났다. 1 ml의 colcemid를 처리한 경우 30분 처리에는 0.25%, 60분 처리에는 1.01%, 90분 처리에서는 0.98% 그리고 120분 처리에는 1.02%로 나타났다. 2 ml의 colcemid를 처리한 경우 30분 처리에는 0.51%, 60분 처리에는 2.35%, 90분 처리에서는 1.85% 그리고 120분 처리에는 2.44%로 나타났다. 슬라이드를 제작할 때 사용되는 세포의 농도에 따라서 달라지지만 일반적으로 슬라이드 1개에 100~500개 사이의 세포핵이 존재

한다. 슬라이드 1개에 적어도 1개 이상의 분열된 염색체를 발견하기 위해서는 최소 1%의 비율로 발견이 되어야 한다. 따라서 유사분열 억제제를 위한 최적의 colcemid의 처리 용량과 시간은 1 ml의 용량과 2 ml의 용량 모두에서 60분 ~ 120분 사이로 나타났다.

슬라이드 제작을 위하여 세포를 떨어트리는 슬라이드 글라스와 마이크로피펫 사이의 높이를 알아보기 위하여 10 cm, 20 cm, 40 cm 그리고 60 cm의 다양한 높이에서 세포 부유액을 떨어트렸다. 높이가 높을수록 세포막이 효과 적으로 터짐을 알 수 있다. 하지만 높이가 너무 높아지면 세포액이 번지는 범위가 넓어져 세포의 일부분이 슬라이드 글라스에서 벗어나게 되었다. 높이가 10 cm에서는 약 45%의 세포만이 파괴가 되었다. 높이가 20 cm 이상이 되면 75% 이상 세포막이 파괴됨을 알 수 있었다. 세포막을 90% 이상 파괴하고 떨어트린 세포가 슬라이드 글라스 밖으로 번지지 않는 높이는 40 cm이었으며, 높이가 60 cm 이상이 되면 세포가 슬라이드 글라스의 범위를 벗어나게 되어 정상적인 실험을 수행할 수 없었다.

최적의 건조 시간을 알아보기 위하여 40℃, 50℃, 60℃ 그리고 70℃에서 4시간 동안 건조를 하였다. 낮은 온도로 건조를 하면 염색체가 넓은 범위에 퍼지게 되어 이웃한 염색체의 범위와 겹치게 되어 염색체 수를 계산할 수 없었다. 반면 높은 온도로 건조를 하면 염색체가 충분히 흩어지지 못하여 서로 겹치는 염색체가 발생하게 되어 염색체 수를 계산할 수 없었다. 일정한 온도로 건조를 하여도 염색체의 흩어짐 정도는 과도한 것과 부족한 것 그리고 좋은 것이 서로 혼재 되어 있다. 또한 염색체가 과도하게 흩어지면 몇 개의 세포에서 방출된 염색체 인지가 확인이 불가능 하였다.

예비실험을 바탕으로 최적의 염색체 검사 방법을 확인하고 검체에 대한 염색체를 확인하였다. T-25 cell culture flask에 자라고 있는 골렐세포에 2 ml의 colcemid를 60분 처리하고, 세포를 고정을 시킨 후 40 cm 높이에서 떨어트리고 60℃에서 4시간동안 충분히 건조를 시켰다. 건조된 슬라이드를 methylene blue로 염색을 하고 현미경으로 염색체를 관찰하였다. 100개의 슬라이드를 제작하여 염색체의 수를 확인한 결과 염색체수가 달라진 비율은 17%로 나타났다.

표 17-4. Colcemid 처리 농도와 시간에 따른 염색체 발견 비율

농도 (5 µg/ml)	시간			
	30 분 (%)	60 분 (%)	90 분 (%)	120 분 (%)
0.5 ml	0.05	0.12	0.14	0.82
1 ml	0.25	1.01	0.98	1.02
2 ml	0.51	2.35	1.85	2.44

염색체 검사를 위한 유사분열 억제제로는 colcemid가 대표적이다. Colcemid의 작용은 방추사 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, colcemid의 처리시간과 농도는 염색체 수축(chromosome condensation)과 관련이 있다고 알려져 있다. Colcemid의 농도가 높고 처리시간이 길어지면 염색체가 수축되기 때문에 최적의 농도와 시간으로 처리를 하여야 한다. 이를 위하여 colcemid의 농도 및 처리 시간에 대하여 실험을 하였다.

실험결과 검체의 유사분열 억제를 위한 최적의 colcemid의 처리 용량과 시간은 1 ml의 용량에서는 120분, 2 ml의 용량에서는 60분 ~ 120분 사이였다. 많이 연구된 사람 혈액의 경우는 colcemid를 1시간 정도 처리하며, 사람 조직에서 분리된 세포의 경우는 2-3시간 처리하는 것과 비교를 하면 처리시간에 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한, 슬라이드 제작을 위하여 세포를 떨어트릴 때 높이가 너무 높아지면 세포액이 번지는 범위가 넓어져 세포의 일부분이 슬라이드 글라스에서 벗어나게 되며, 높이가 너무 낮으면 세포막이 충분히 터지지 않는다. 세포가 슬라이드 글라스 밖으로 나가지 않으며 세포막이 충분히 파괴되는 최적의 높이는 40 cm로 나타났다.

슬라이드의 건조 시간도 염색체 검사를 위한 실험에서 매우 중요한 변수이다. 슬라이드를 너무 낮은 온도로 건조를 수행하면 염색체가 넓은 범위에 퍼지게 되어 염색체 수를 계산할 수 없으며, 너무 높은 온도로 건조를 하면 서로 겹치는 염색체가 발생하게 된다. 최적의 온도를 찾기 위하여 실험을 반복하였으나 일정한 온도로 건조를 하여도 염색체의 흩어짐 정도는 과도한 것과 부족한 것 그리고 좋은 것이 서로 혼재되었다. 통계적으로 산출을 하지는 못 하였으나 경험적으로 판단을 하면 60℃의 건조 온도가 가장 좋았다. 건조 조건은 온도 이외에도 습도와 건조를 하는 기계의 방식(순환식 혹은 폐쇄식)에 따라서 건조의 시간은 달라지게 된다. 따라서 일률적으로 건조 온도를 설정할 수는 없다.

각 실험실의 상황에서 60℃를 기준으로 예비 실험을 수행하여 염색체의 흩어짐 정도를 파악하는 것이 바람직할 것으로 사료가 된다. 예비 실험에서 염색체가 너무 많이 흩어지면 건조 온도를 올리고, 염색체가 너무 많이 뭉쳐 있으면 건조 온도를 낮추면 될 것이다.

표 17-5. 세포와 슬라이드 글라스의 유격에 따른 세포막의 파괴 비율

Height	10 cm (%)	20 cm (%)	40 cm (%)	60 cm (%)
세포막 파괴 비율	24 %	65 %	92 %	95 %
슬라이드 글라스에서 벗어난 유무	없음	없음	없음	벗어남

표 17-6. 부유형 세포와 부착형 세포의 염색체 검사결과

샘플		정상세포 비율	암세포 비율	판단불가 비율	전체 암세포화 비율
세대수	세포 종류				
1	부유형 세포	84 %	8 %	8 %	9.25 %
2		87 %	11 %	2 %	
3		82 %	6 %	12 %	
4		88 %	7 %	5 %	
5		91 %	6 %	3 %	
6		84 %	11 %	5 %	
7		86 %	10 %	4 %	
8		83 %	15 %	2 %	
1	부착형 세포	72	12	16	11.8%
2		84	14	2	
3		82	8	10	
4		78	11	11	
5		85	16	9	
6		82	15	3	
7		75	9	16	
8		84	10	6	

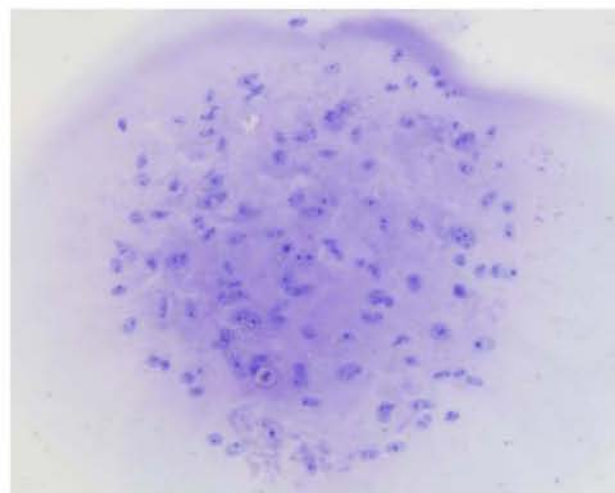
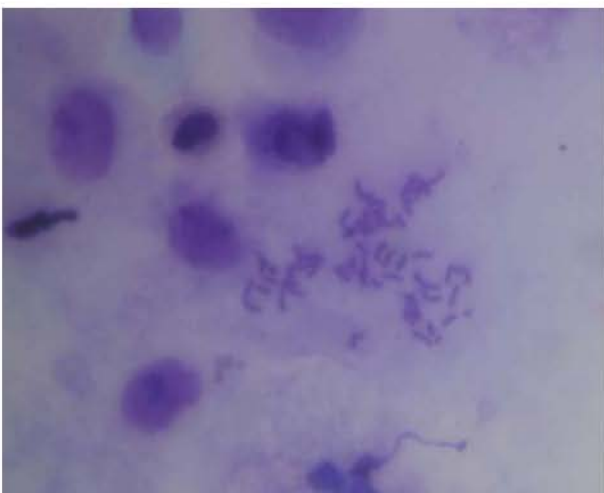


그림 17-31. 염색체가 노출된 모습. 건조시간이 짧아 염색체가 과도하게 뭉쳐져 있는 상태

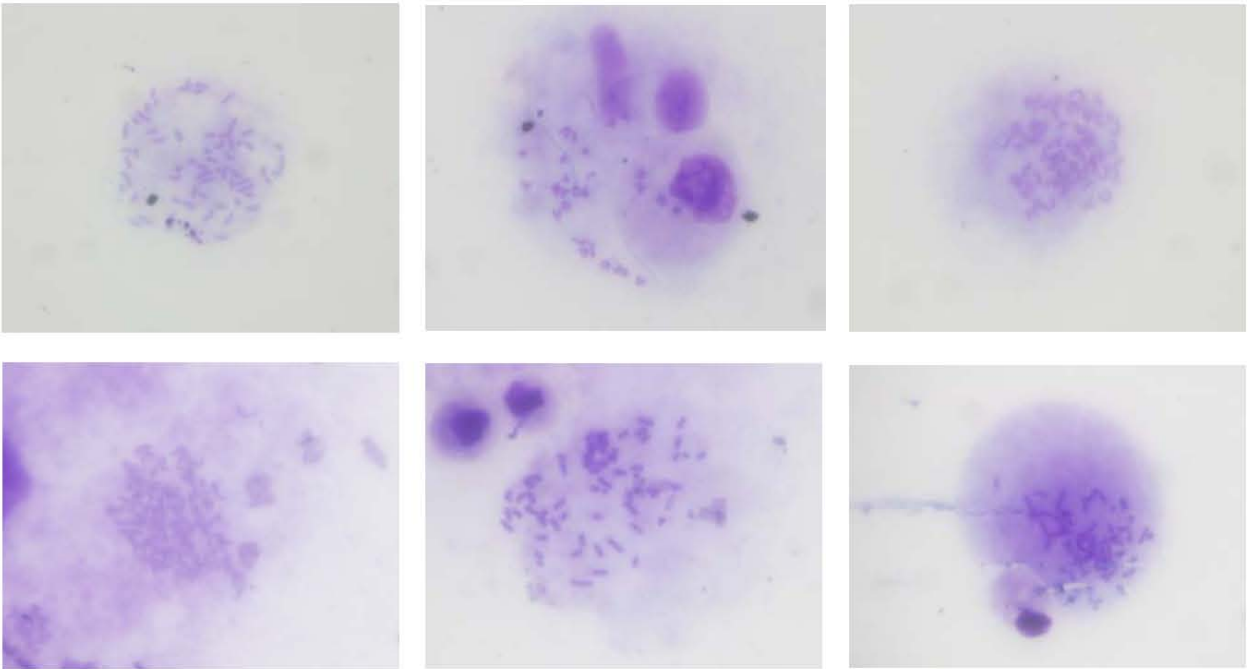


그림 17-32. 건조 시간에 따른 염색체의 흩어짐 정도.

건조 시간이 짧으면 염색체가 뭉쳐지게 되며, 건조 시간이 너무 길면 과도하게 흩어져 다른 세포의 염색체와 섞이게 된다.

제 18 절 꿀벌 유래 신 세포배양 기법

1. 실험방법의 개관

가. 꿀벌 알 수집

본 연구에 사용된 꿀벌은 경기대학교 양봉장에서 육종되는 *Apis mellifera*이며, 멸균된 이충기를 이용하여 꿀벌 소비에서 알 20 - 30개를 6-well 배양용기로 옮겨 실험실로 이동한 후 실험에 사용하였다.

나. 멸균액 및 멸균과정

수집된 알의 표면을 멸균하기 위한 멸균액은 두 종류로 첫 번째는 70% 에탄올이 포함된 phosphate buffered saline (PBS)이며, 두 번째는 0.525% sodium hypochlorite, 0.1% Tween 20, 0.5% benzalkonium chloride, 70% 에탄올이 포함된 증류수를 이용하였다. 6-well 배양용기에 각각의 멸균액을 넣고 알을 첨가하여 5회 흔들어서 주어 멸균한 후, 멸균액을 수세하기 위해 PBS가 담긴 배양용기에 알을 옮겨준 후 10회 흔들고, 수세과정을 2회 반복하였다.

다. 꿀벌세포의 일차세포배양을 위한 적절한 배양액 선별

멸균된 알을 e-tube에 옮기고 200 μ l의 성장배양액을 넣어주었다. 1.5ml pestle를 사용하여 5 - 10회 힘을 가해 누르고 돌려 알을 분쇄시킨 후 800 μ l 성장배양액을 첨가하여 10 - 20회 pipetting을 실시하여 서로 붙어있는 세포들을 분리하였다. 성장배양액은 문헌을 참고하여 다음의 3종류를 사용하였다.

첫 번째는 20% fetal bovine serum, insect media supplement, yeast extract, 1% D(+) trehalose dehydrate, 0.1% poloxamer188, 0.5% gentamycin을 포함한 Grace's insect media이며, 두 번째는 Grace's insect media 대신 Hink's TNM-FH Media를 사용한 것을 제외하고 첫 번째 배양액과 모든 조성이 같다. 세 번째는 첫 번째 배양액과 모든 조성이 같고 Grace's insect media 대신 Schneider's insect media를 사용하였다. 마지막으로 L15 insect media를 기본 배양으로 사용하였다. 각각의 기본 배양액을 토대로 그 조성을 다르게 하여 총 8종류의 꿀벌세포 배양액을 조성하고 분리된 세포의 성장여부를 확인하였다. 분리된 세포들은 24-well 배양용기로 옮겨져 30 $^{\circ}$ C 조건하에서 배양되었으며, 1일, 4일, 8일차에 각각의 세포모양을 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.

라. aggregation culture

분쇄된 알조직을 포함한 성장배양액을 세포가 바닥에 붙어 자라지 못하도록 코팅되지 않은 96

웰 플레이트에 옮겨 30 ℃ 조건하에서 배양하였다. 3~4일 배양 후, 기존 성장배양액 부피의 3/4를 새로운 웰에 옮겨주고, 이전 웰에는 새로운 배양액을 3/4 부피만큼 채워 배양하고, 3~4일 후 이 과정을 반복하였다. 이렇게 하여 세포군집을 만들어 성장한 세포를 원심분리하여 상층액을 제거하고 새로운 배지를 넣어 48웰로 옮겨 배양하였다. 이때를 계대(passage, P) 1이라 정하고, 이후 3~4일에 한번 씩 새로운 배지로 교환하면서 계대를 기록하였다.

마. 세포증식 측정

각 계대의 세포에 0.4% 트리판 블루(trypan blue) 염색약을 이용하여 염색하고 헤마토사이토미터(hemocytometer)로 세포수를 측정하였으며,

바. PCR 기법을 이용한 꿀벌 유래 세포의 확인

배양된 세포가 꿀벌 세포임을 확인하기 위해 PCR 기법을 이용하여 수행하였다. 표적 유전자는 꿀벌 라미닌 A(Laminin A; LanA)를 코딩하는 유전자이고, 제작된 PCR 프라이머로는 표 18-1에 나타낸 프라이머 세트를 사용하였다.

forward	: 5'-tta aga tcc cca gga tca tg-3'
reverse	: 3'-ggt atc cac gtc ata aac gt-5'

표 18-1. 꿀벌 라미닌 A 검출 PCR 프라이머

음성 대조군으로는 인간 유래 세포인 293T 세포주를 이용하였고, 양성 대조군으로는 꿀벌 알과 에벌레를 이용하였다. 각각의 세포 및 조직으로부터 DNA 추출 키트(G-spin total DNA extraction kit, Intron사)를 이용하여 게노믹(genomic) DNA를 추출하고 PCR 장치(DNA Polymerase Hot-Start Version, Takara사)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

사. Real time PCR

본 연구에서는 SYBR Green을 이용하였으며, 먼저 mRNA 1 μ l를 reverse transcription을 진행하고, 제작한 cDNA 1 μ l를 주형으로 하여 Real-time PCR을 진행한다. PCR 조건은 전변성 과정 (95℃) 10분, 변성과정 (95℃) 10초, 결합과정 (50~62℃) 30초, 신장과정 (72℃) 30초의 과정을 30~40회 반복하였고, 신장과정 1회마다 형광을 측정하였으며, 증폭 반응이 모두 끝나면 변성곡선(melting curve)을 확인하기 위해 60℃~95℃까지 1초에 0.5℃씩 상승시켜 5초마다 형광을 측정하였다. 절대정량은 표준 샘플(Standard sample)을 이용하여 검량선(Standard curve)을 작성하여 미지의 샘플의 절대량을 및 PCR 증폭 효율등을 알 수 있었으며, 상대정량은 유전자의 발현량을 상대적으로 비교하는 것으로 interanal control로 beta-actin을 사용하였다.

2. 꿀벌 알 수집 및 배양

멸균된 이충기를 이용하여 꿀벌 소비에서 알 20~30개를 6-well 배양용기로 옮겼다. 보온을 위해 배양용기를 보온통에 넣어 실험실로 옮긴 후 실험을 진행하였다.

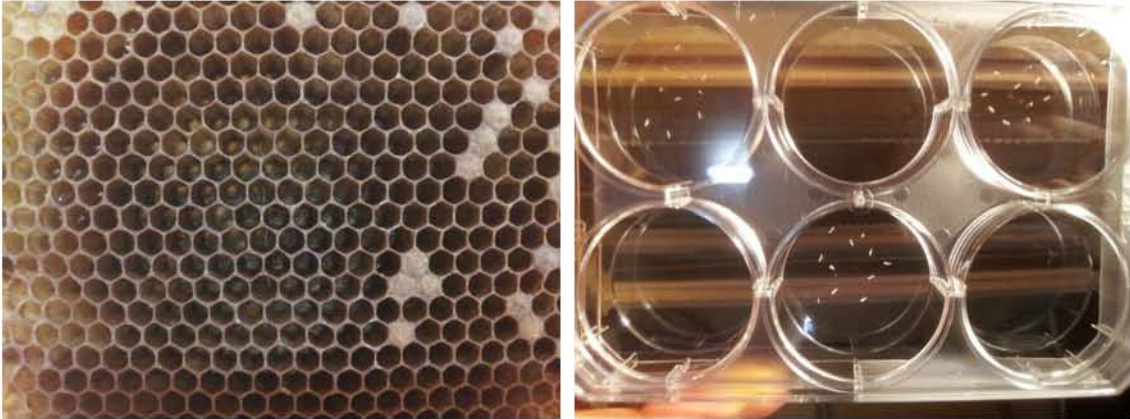


그림 18-1. Honey bee egg harvest

가. 멸균 방법의 선별

두 종류의 멸균액을 대상으로 선별과정을 거쳤다.

(1) 70% 에탄올 용액

- 꿀벌의 알을 70% 에탄올이 포함된 PBS에 넣고 배양용기를 5회 흔들어 멸균하였다. 에탄올을 수세하기 위해 PBS에 담긴 well에 알을 옮겨준 후 10회 흔들고 이 과정을 2회 반복하였다. 30 ℃에 적용된 성장배양액을 비어있는 6-well 배양용기에 넣어주고, 멸균과 수세가 끝난 알을 모두 넣어주었다.
- 배양 초기에는 세포 외 조직이나 알 표피가 주로 관찰되다가 배양이 지속될수록 contaminant들이 성장하여 꿀벌 세포의 성장을 막고 모든 세포를 사멸시켰다 [그림 1].
- 따라서 이 멸균방법은 완전한 멸균이 되지 않는 것으로 보이며, 문헌조사를 통해 멸균액을 사용하는 방법을 강구하였다.

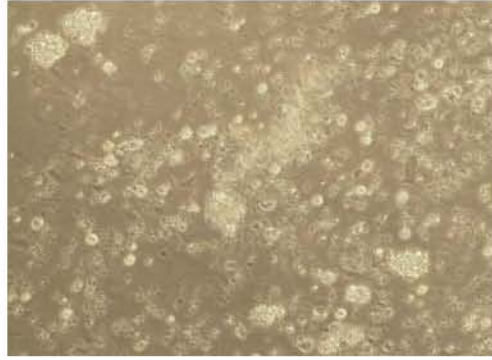


그림 18-2. 70% Ethanol을 이용한 멸균

(2) 멸균액 제조

- Goblirsch et al., 2013 논문을 응용하여 멸균액을 제조하였다(표 18-2). 멸균액을 알에 뿌려주고 1분간 정지한 후 1×PBS로 2회 수세하였다. 그 후, 30 °C에 적응된 성장배양액을 띠 6-well 배양용기에 넣어주고, 멸균과 수세가 끝난 알을 모두 넣어주었다.
- 에탄올의 방법과 같이 배양초기에는 세포 외 미세 조직이나 알 표피가 주로 관찰되었고, 배양이 지속될수록 이들은 사라지고 깨끗한 꿀벌세포만이 성장하였다.

표 18-2. Sterilization buffer

0.525% sodium hypochlorite
0.1% Tween 20
0.5% benzalkonium chloride
70% ethanol



그림 18-3. 멸균액을 이용한 멸균

나. 조직분쇄 및 단일 세포 획득 방법 선별

- 두가지 방법으로 조직을 분쇄하여 세포를 획득하였다.

(1) 화학적 및 물리적 방법

- 0.25% trypsin-EDTA 2ml에 멸균된 알을 넣고 파이펫으로 4분간 빨아들이고 내뱉기를 반복한 후 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 1×PBS로 2회 수세 한 후 성장배양액을 넣어 배양하였다. 초기에 많은 세포들이 trypsin-EDTA에 의해 사멸되어 배양용기의 바닥에 붙는 세포는 관찰되지 않았다.

(2) 물리적 방법

- Pipetting: 성장배양액에 알을 옮겨주고, 파이펫으로 4분간 빨아들이고 내뱉기를 반복하였다. 이 경우 세포는 분리되어 나오나 분해되지 않는 조직이 많이 보였다.
- Pestle 이용: 멸균된 알을 e-tube에 넣고 1.5ml pestle를 사용하여 5~10회 분쇄시킨 후, 성장배양액을 첨가하여 배양하였다. 이 방법을 통해 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

다. 꿀벌 세포 배양에 적절한 세포 성장 배양액 선별

- 총 8가지의 성장 배양액을 이용하여 적합한 세포 배양액을 선별하였다. 특히 본 연구에서 선별한 기본 배양액 (Grace's insect media, Hink's TNM-FH Media, Schneider's insect media, 그리고 L15 insect media)은 곤충세포 배양액 중 가장 이용 빈도가 높은 배양액들이며 (Zapata Lesmes et al. 2005, Segura et al. 2012, Ju and Ghil, 2013), 그 이외에 첨가되는 첨가물들 역시 성공적으로 곤충세포를 배양했던 문헌들에서 사용했던 것을 이용하였다 (Marutani-Hert et al. 2009, Hunter 2010, Zhang et al. 2011, 2012).

(1) Grace's 배양액 (Grace, 1962) (꿀벌세포 성장 배양액-1)

- Grace's 배양액을 이용하여 (표 18-3)와 같이 성장배양액을 조성하였고, 위의 실험방법으로 꿀벌세포를 분리하여 배양하였다.
- 배양 1일~4일에는 주로 부유되어 성장하는 세포들이 많았고, 성장이 지속될수록 세포들이 사멸하였다 (그림 18-4).

표 18-3. 성장 배양액-1의 조성

Grace's Insect 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Total	10ml

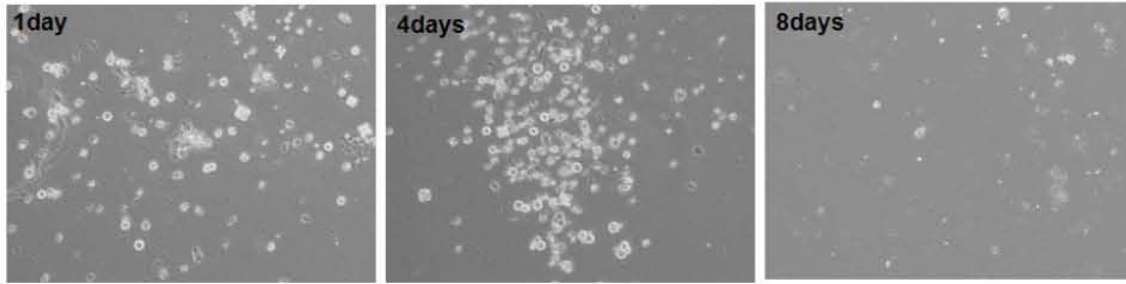


그림 18-4. 꿀벌세포 성장 배양액-1을 이용한 꿀벌세포 배양

- 세포성장을 안정적으로 유지하기 위해 기존 Grace's 배양액에 Cod liver oil fatty acid methyl esters를 추가하여 배양액 (꿀벌세포 성장 배양액-2)을 조성하였다(표 18-4).
- 그러나 세포가 2일 이상 성장하지 못하고 사멸하였다(그림 18-5).

표 18-4. 꿀벌세포 성장 배양액-2의 조성

Grace's Insect 배양액	6.24ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Cod liver oil fatty acid methyl esters	0.01ml
Total	10ml



그림 18-5. 꿀벌세포 성장 배양액-2를 이용한 꿀벌세포 배양

(2) Hink's TNM-FH 배양액 (꿀벌세포 성장 배양액-3)

- Hink's TNM-FH 배양액을 이용하여 표 18-5와 같이 성장배양액을 조성하였고, 위의 실험방법으로 꿀벌세포를 분리하여 배양하였다.
- 배양 1일~4일에는 주로 부유되어 성장하는 세포들이 많았고, 성장이 지속될수록 세포들이 사멸하고 8일째 모든 세포들이 사멸하였다(그림 18-6).

표 18-5. 꿀벌세포 성장 배양액-3의 조성

Hink's TNM-FH 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gentamicin	0.05ml
Total	10ml

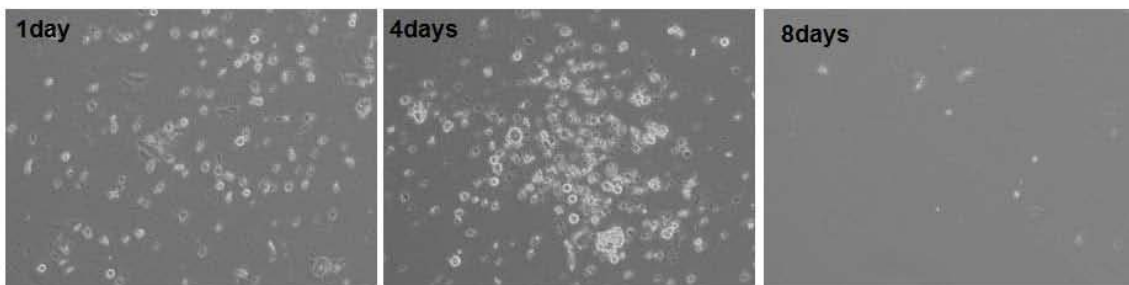


그림 18-6. 꿀벌세포 성장 배양액-3을 이용한 꿀벌세포 배양

- 기존 Hink's TNM-FH 배양액을 이용한 꿀벌세포 성장 배양액-3에 Cod liver oil fatty acid methyl esters를 추가하여 배양액 (꿀벌세포 성장 배양액-4)을 조성하였다(표 18-6).
- 그러나 세포는 2일 이상을 성장하지 못하고 사멸하였다(그림 18-7).

표 18-6. 꿀벌세포 성장 배양액-4의 조성

Hink's TNM-FH 배양액	6.24ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Cod liver oil fatty acid methyl esters	0.01ml
Total	10ml



그림 18-7. 꿀벌세포 성장 배양액-4를 이용한 꿀벌세포 배양

(3) Schneider's 배양액 (꿀벌세포 성장 배양액-5)

- Schneider's 배양액을 이용하여 표 6과 같이 배지를 조성하였고 위의 실험방법으로 꿀벌 세포를 분리하여 배양하였다.
- 배양 1일~4일에는 주로 부유되어 성장하는 세포들이 많았고, 성장이 지속될수록 세포들이 사멸하였다. Grace's Insect 배양액, Hink's TNM-FH 배양액과 비교할 경우 가장 높은 생존율을 보였다(그림 18-8).

표 18-7. 꿀벌세포 성장 배양액-5의 조성

Schneider's Insect 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Total	10ml

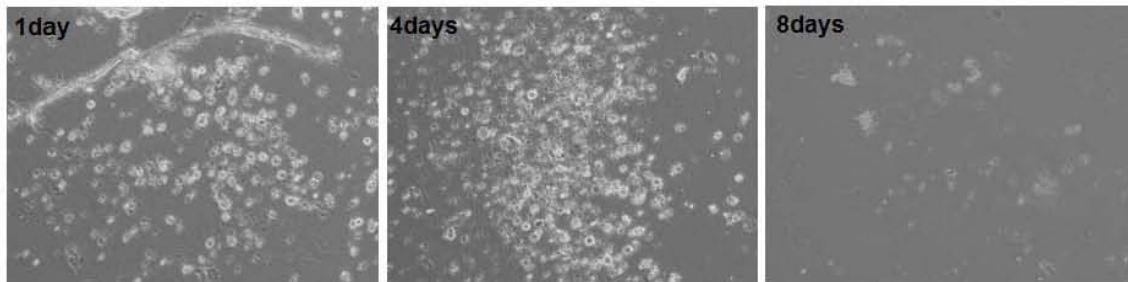


그림 18-8. 꿀벌세포 성장 배양액-5를 이용한 꿀벌세포 배양

- 기존 Schneider's 배양액을 이용한 꿀벌세포 성장 배양액-5에 Cod liver oil fatty acid methyl esters를 추가하여 배양액 (꿀벌세포 성장 배양액-6)을 조성하였다(표 18-8).
- 적은 수의 세포가 2일째까지 생존하였고, Grace's 및 Hink's TNM- FH 배양액과 비교할 경우 가장 높은 생존율을 보였다(그림 18-9).

표 18-8. 꿀벌세포 성장 배양액-6의 조성

Schneider's Insect 배양액	6.24ml
FBS	2ml
Insect medium supplement (×10)	1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Poloxamer 188 solution (10%)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Cod liver oil fatty acid methyl esters	0.01ml
Total	10ml



그림 18-9. 꿀벌세포 성장 배양액-6을 이용한 꿀벌세포 배양

- Schneider's 배양액을 이용하여 표 8과 같이 배지를 조성하였고 (꿀벌세포 성장 배양액-7), 위의 실험방법으로 꿀벌세포를 분리하여 배양하였다.
- 많은 수의 세포가 분리되어 바닥에 부착된 형태로 성장하였고, 배양 3일차까지 fibroblast 형태로 성장하다 5일 이후 사멸하였다(그림 18-10).

표 18-9. 꿀벌세포 성장 배양액-7의 조성

Schneider's Insect 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
Sodium pyruvate (100mM)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
Total	10ml

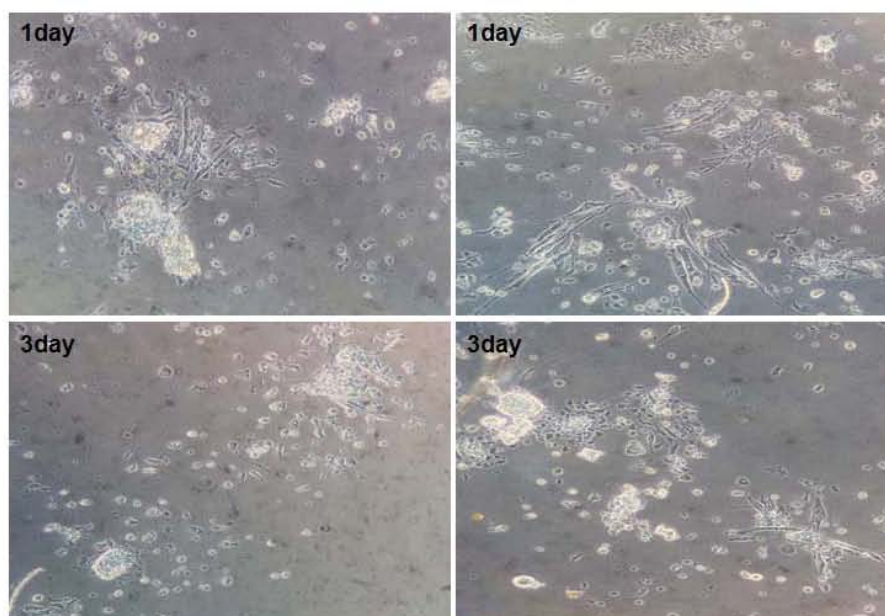


그림 18-10. 꿀벌세포 성장 배양액-7을 이용한 꿀벌세포 배양

(4) L15 배양액

- L15 배양액을 이용한 성장배지(꿀벌세포 성장 배양액-8)를 표 18-10.와 같이 제조하여 실험에 이용한 결과, 배양 2일에 조직에서 세포들이 뚫어 나와 바닥에 부착하며 성장하고 성장이 지속될수록 붙어있던 조직은 떨어지고 세포들만 성장하였다.
- 세포분리한 후 10일 이상 생존 가능하였으며 그 기간 동안 건강한 상태를 유지하였다. 조직 분쇄시 단일 세포들로 분해되는 것보다 조직으로 분해되어 세포로 분리되어 성장되는 조건이 초기에 단일세포 조건보다 세포성장에 더 유리하다고 사료되어 조직분쇄 횟수를 줄여 실험한 결과 더 좋은 결과를 확보하였다(그림 18-11).

표 18-10. L15 배양액을 이용한 성장 배양액 조성 (꿀벌세포 성장 배양액-8)

L15 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Sodium pyrovate (100mM)	0.1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
HEPES (1M)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
NaHCO ₃ (100mM)	0.01ml
Amino acid (x50)	0.5ml
Vitamin (x1000)	0.01ml
Total	10ml

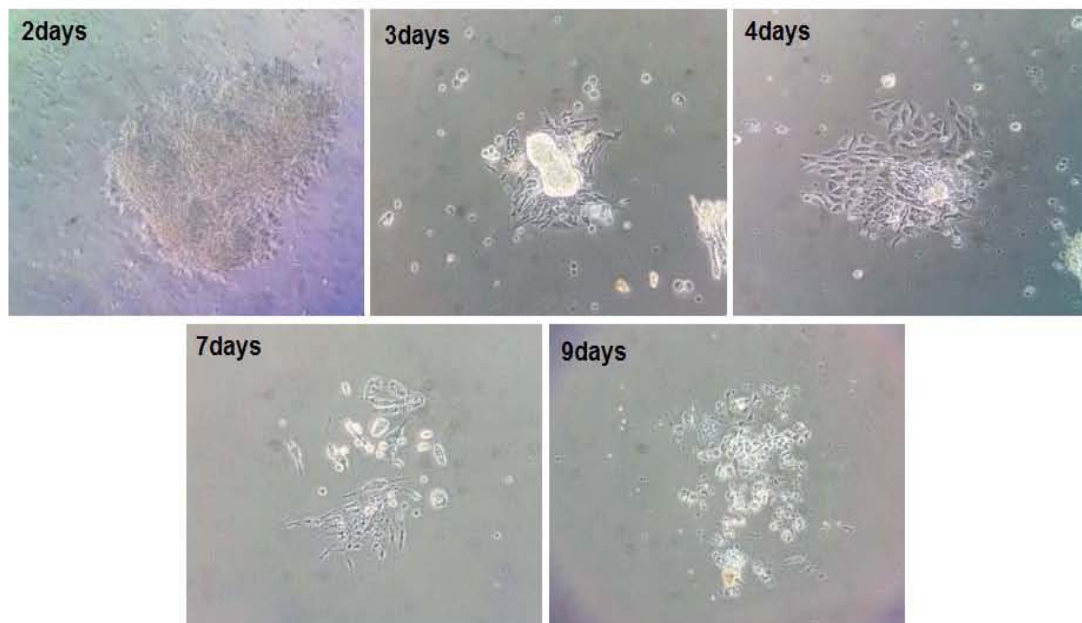


그림 18-11. L15 배양액을 이용한 세포 배양 (꿀벌세포 성장 배양액-8)

라. 배양 온도 조건 선별

(1) 27℃ 배양

- 꿀벌세포를 분리하여 꿀벌세포 성장 배양액-8 배양액으로 27℃ 조건에서 배양하였으나, 세포가 안정적으로 성장하지 못하고 4일 이후에 모두 사멸하였다.

(2) 30℃ 배양

- 같은 배양액으로 세포를 분리하여 30℃ 조건에서 배양한 결과, 27℃ 조건에 비하여 많은 수의 세포가 부착되어 성장하였고, 오랫동안 성장이 지속되었다.
- 따라서 30℃ 배양 조건이 적절할 것으로 사료된다.

마. Aggregation culture를 이용한 꿀벌 세포 배양

- 일반적으로 일차세포 배양 초기에 세포가 단독으로 성장할 경우, 여러 가지 요인에 의해 성장이 제대로 이루어지지 않는 경우가 있다. 이를 해결하기 위해 세포의 집단을 만들어 aggregation culture를 하는 경우가 있다.
- 특히 배아세포, 신경세포, 암세포, 곤충세포의 일차배양 세포의 분리과정에서 aggregation culture를 하는 경우가 많이 발견된다 (Bergem, et al. 2006, Morrison, et al. 2012, Park, et al. 2014, van den Brink, et al. 2014).
- 본 연구에서는 이러한 문헌을 토대로 하여 꿀벌의 일차세포배양시 안정성을 부여하기 위해 aggregation culture를 하였다.

(1) 세포배양액의 계대배양을 통한 aggregation culture

- 채집한 꿀벌 알을 멸균액을 이용하여 멸균하고 분쇄하여 coating되지 않은 96-well plate에 배양하였다.
- 3 - 4일 배양 후 3/4를 새로운 well로 옮겨주고, 이전 well에는 새로운 배양액 3/4을 채워 배양하고, 3~4일 후 이 과정을 반복하였다(그림 18-12).
- 계속 세포의 상등액을 옮겨주면서 배양한 결과, 세포들은 서로 aggregate를 형성하였으나, 10 - 12일 후 모두 박테리아 또는 효모에 감염되었다.

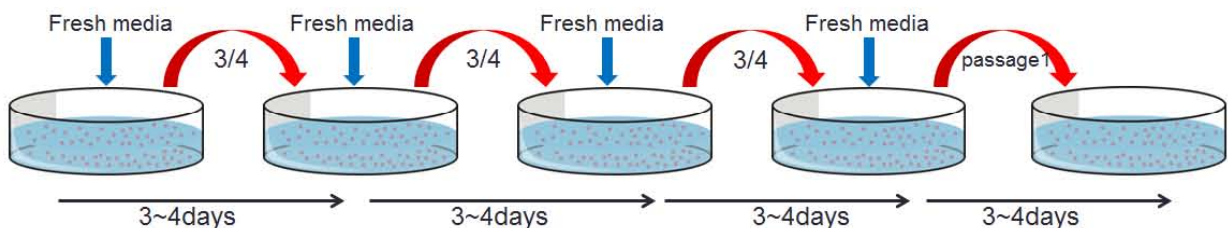


그림 18-12. 세포배양액의 계대배양을 통한 aggregation culture

(2) 원심분리를 이용한 계대배양

- 앞의 실험의 오염문제를 해결하기 위해, 3번째 계대배양시 세포를 원심분리하는 방법을 이용하였다. 이때 상층 배양액을 제거하고 새로운 배지를 넣어 48-well로 옮겨 배양하였다 (그림 18-13).
- 이후 3~4일에 한번씩 원심분리를 통해 새로운 배지로 교환하고, passage를 차례대로 기록하였다.

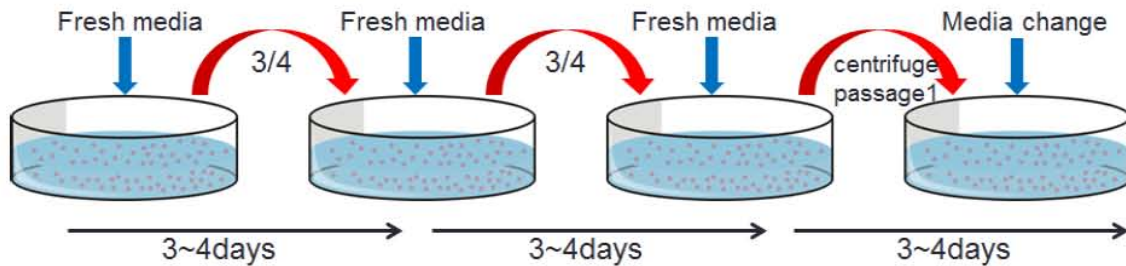


그림 18-13. Aggregation culture

- Aggregation culture시 현미경으로 관찰한 결과 단일세포로 존재하거나 큰 클러스터를 이루어 성장함을 확인하였다(그림 18-14).. 그리고 배양액이 오염되는 현상은 급격히 저하되었다.

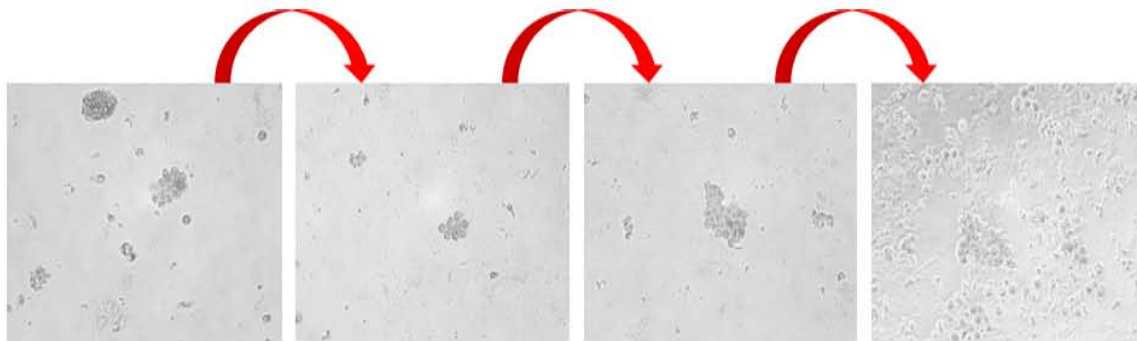


그림 18-14. Morphological phenotypes of each well

- 각 passage별 세포의 모습을 그림 18-15에 나타내었다.

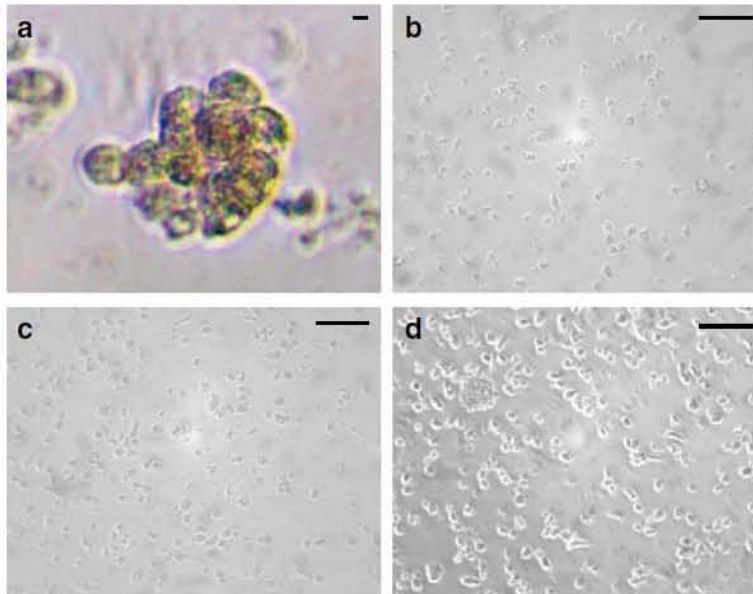


그림 18-15 각 passage별 세포의 모습

a, aggregate culture; b, passage 1; c, passage 3; d, passage 5. scale bar 200 μm

바. 세포배양액 별 세포 성장 확인

- 꿀벌 세포의 단독배양 보다는 aggregation culture 방법이 세포의 성장에 좋은 효과를 미치는 것을 확인하였다.
- 그렇다면 앞서 사용했던 기본 배양액중 비교적 효과가 좋았던 Schneider's와 L15 배양액중 어떤 기본 배양액이 세포의 성장에 긍정적 효과를 보이는지 확인하였다.

(1) Schneider's 배양액

- Schneider's 배양액을 이용한 성장배양액을 표 18-11과 같이 조성하였고, 위의 실험방법을 사용하여 세포를 분리하여 배양하였다.
- Passage(P)1에서는 embryonic body모양으로 성장하다가 passage가 지속 될수록 단일 세포로 성장하였다(그림 18-16).

표 18-11. Schneider's 꿀벌세포 성장배양액 조성

Schneider's Insect 배양액	6.25ml
FBS	2ml
Sodium pyrovate (100mM)	0.1ml
Yeast extract ultrafiltrate (×50)	0.5ml
D(+) Trehalose dihydrate	0.1ml
HEPES (1M)	0.1ml
Gemtamicin	0.05ml
NaHCO ₃ (100mM)	0.01ml
Amino acid (x50)	0.5ml
Vitamin (x1000)	0.01ml
Total	10ml

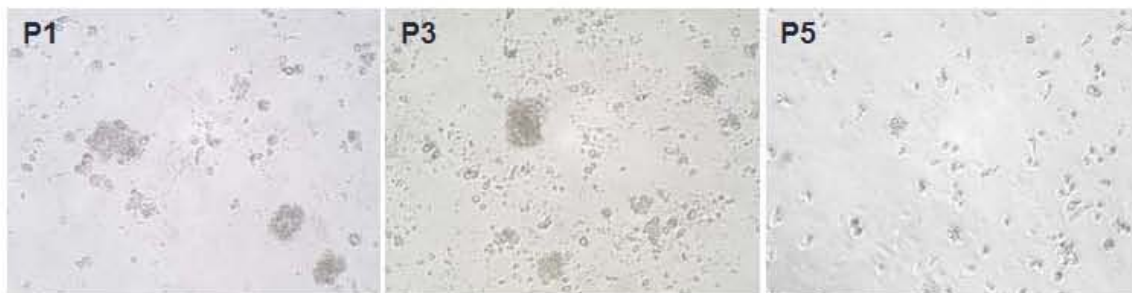


그림 18-16 Schneider's 꿀벌세포 성장배양액을 이용한 꿀벌세포 배양

(2) L15 배양액

- 표 18-11의 배양액에서 Schneider's 배양액 대신 L15 배양액을 이용하여 배지를 조성하였고 위의 실험방법으로 꿀벌세포를 분리하여 배양하였다.
- P1에서는 뭉쳐져서 성장하다가 passage가 지속될수록 단일세포로 성장하고, 초기 세포 수에 비해 증가함을 확인하였고, 성장도 10 passage, 50일 이상 지속됨을 확인하였다(그림 18-17).

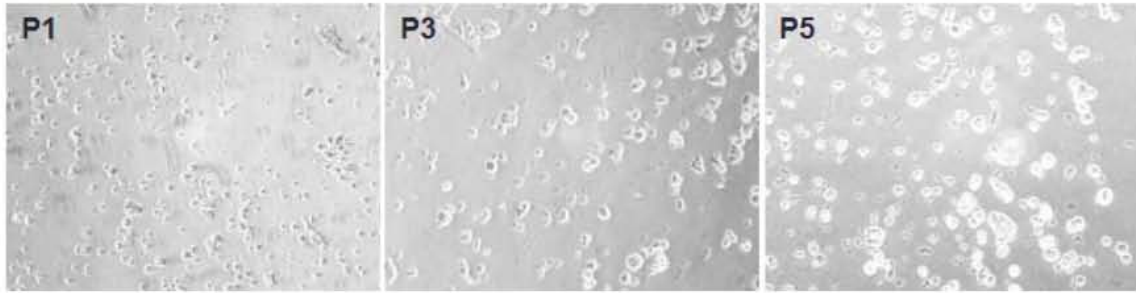


그림 18-17. L15 꿀벌세포 성장 배양액을 이용한 꿀벌세포 배양

사. 세포 증식속도 측정

- 두 가지 배양액에 의한 꿀벌세포의 증식 정도의 차이를 확인하기 위해 각 passage마다 세포 수를 측정하였다.
- 각 시기의 세포에 0.4% trypan blue 염색약을 이용하여 염색하고 hemato-cytometer로 세포수를 측정하였다.
- Schneider's 배양액과 L15 배양액 별로 세포증식을 측정한 결과 초기에는 모두 증가하지만 배양이 지속될수록 Schneider's 배양액에서는 세포증식이 차츰 감소하고, L15 배양액에서는 꾸준히 성장함을 확인하였다(그림 18-18).

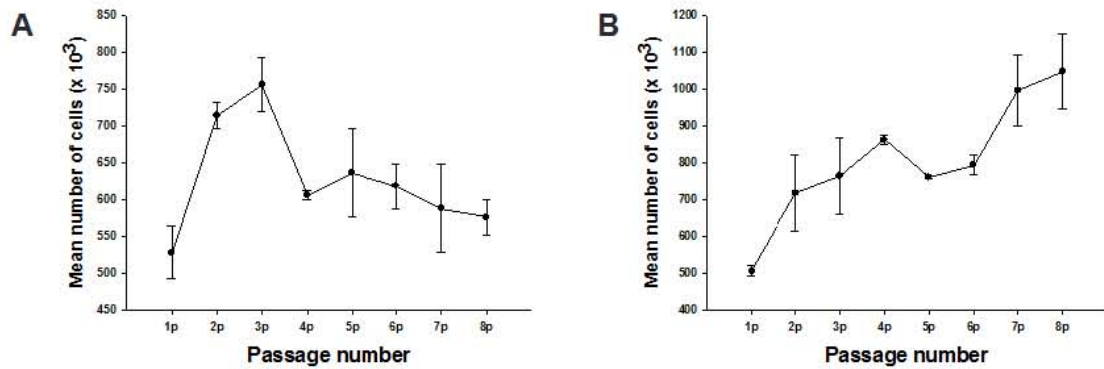


그림 18-18. 꿀벌세포의 성장 곡선.

A. Schneider's 꿀벌세포 성장 배양액. B. L15 배양액

- 두 가지 배양액을 대상으로 세포성장을 passage별로 비교한 결과, Schneider's 배양액을 이용했을 경우 보다 L15 배양액을 이용했을 때, 안정적이고 지속적인 성장속도를 보임을 알 수 있었다(그림 18-19).

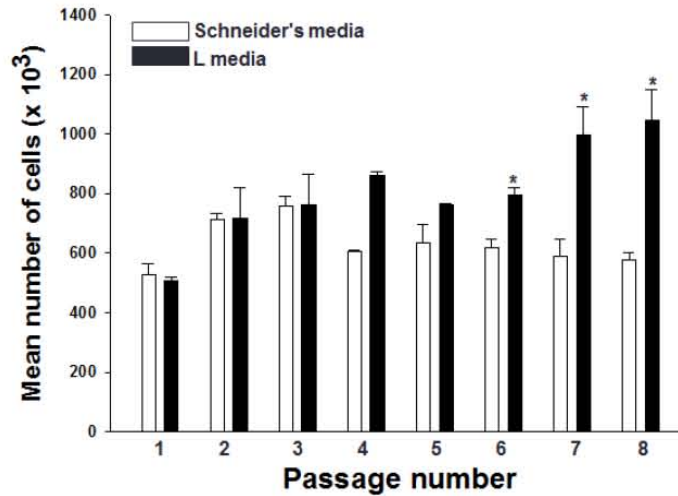


그림 18-19. Aggregation culture시 세포 성장액에 따른 세포 성장 속도 비교

- L15 배양액에서 성장한 세포는 50 passage까지 약 7개월 동안 그 성장이 지속되었으며, 그림 18-20의 사진은 45 passage에 자라고 있는 꿀벌 세포를 DAPI로 염색하여 정상적인 핵의 모습을 보여주고 있다 (Ju and Ghil, 2015).



그림 18-20. 꿀벌-유래 세포의 DPAI 염색

아. 꿀벌-유래 세포의 확인

- PCR기법을 이용하여 배양된 세포가 꿀벌세포임을 확인하고자 하였다. 이때 사용한 표적 유전자는 꿀벌의 laminin 단백질을 코딩하는 유전자이다.
- 제작된 PCR 프라이머는 forward: 5'-tta aga tcc cca gga tca tg-3'와 reverse: 3'-gtt atc cac gtc ata aac gt-5'이었다.
- 음성 대조군으로는 인간유래 세포인 293T 세포주를 이용하였고, 양성대조군으로는 꿀벌 알(egg)과 애벌레(larva)를 이용하였다.
- 각각의 세포와 조직을 Intron사의 G-spin total DNA extraction kit를 이용하여 Genomic

DNA를 추출하고, Takara사의 DNA Polymerase Hot-Start Version을 이용하여 PCR을 수행하였다.

- 그 결과, 꿀벌의 알, 애벌레 그리고 배양 세포에서는 laminin 유전자의 발현을 보였으나, 293T 세포에서는 발현되지 않아 배양된 세포는 꿀벌-유래 세포임을 확인하였다(그림 18-21).



그림 18-21. 꿀벌-유래 세포의 확인

3. 꿀벌 유래 배양세포에서 kSBV 감염의 분석

가. 감염된 애벌레로부터 낭충봉아 부패병 바이러스의 확인

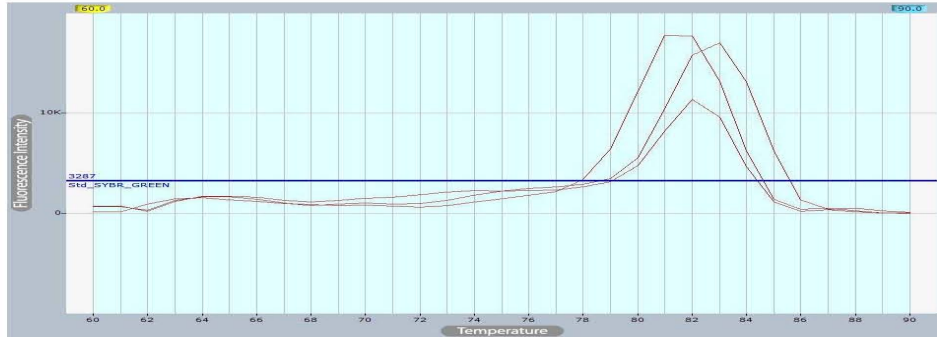
- 낭충봉아 부패병 바이러스의 진단을 위해 감염된 애벌레로부터 RNA를 순수 분리하여 PCR 기법을 이용하여 확인하였다.
- SBV와 kSBV의 두 가지 타입으로 제작된 PCR 프라이머는 SBV; forward (5'-tct aaa atg aga gtg aag t-3')와 reverse (5'-cac agy ttg ttc ctt acc ccc-3'), kSBV; forward (5'-tct aaa atg aga gtg aag t-3')와 reverse (5'-gcg ggc agg aat cta tgt gga-3')이었다.
- 감염된 애벌레의 total RNA을 분리하였고, oligo dT를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 합성된 cDNA을 주형으로 사용하여 PCR과 real time PCR을 수행하였다.
- PCR 결과 감염된 애벌레에서 낭충봉아 부패병 바이러스를 확인하였고, 특히 분리된 바이러스는 SBV에 속함을 알 수 있었다(그림 18-22).



그림 18-22. PCR을 이용한 낭충봉아 부패병 바이러스의 확인.

Lanel. kSBV, Lane2. SBV, Lane3. 감염된 애벌레

- Real time PCR T_m 값을 확인해 보았을 경우 감염된 애벌레 유래 시료에서 SBV와 동일한 T_m 값을 보여주고 있으며, 이것을 통해 분리된 바이러스는 SBV에 속함을 알 수 있었다(그림 18-23).



Sample Name	T_m
<i>kSBV</i>	81.5
<i>SBV</i>	82.5
감염된 애벌레	82.5

그림 18-23. Real time PCR T_m 값을 이용한 낭충봉아 부패병 바이러스의 확인.

나. 꿀벌세포의 kSBV 감염을 위한 샘플의 분리 및 확인

- 샘플 준비: 충북 옥천에서 확보한 kSBV에 감염된 토종벌 시료 0.5 g을 사용하여 세포 감염을 위한 시료 확보를 위해 filtration 과정을 진행하였다.
- 토종벌 시료 0.5 g에 500 μ l의 PBS용액을 첨가한 후 분쇄기 (Tissue tearor, USA)를 사용하여 1분간 30,000 rpm으로 분쇄하였다. 분쇄된 용액을 4 °C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 확보하여 0.45 μ m filter (syringe filter, 25 mm, USA), 0.20 μ m filter (syringe filter, 25 mm, USA)를 사용하여 여과한 후 원심분리하여 최종 300 μ l의 kSBV가 포함된 용액을 확보하였다(그림 18-24).



그림 18-24 원심분리 후 시료의 침전 및 분리

- cDNA 합성: cDNA 합성 조건은 6 μg 의 RNA (5 μl)와 20 pmole의 specific-primer [표 11]를 65 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 합성 진행하며, master mix tube로 옮긴 후, 최종농도 20 μl 가 되도록 하였다. 완성된 tube를 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 cDNA합성을 진행하였다.

표 18-12 . PCR primers

Name	Sequence (5'→3')
kSBV Fwd (positive strand)	TCT AAA ATG AGA GTG AAA GT
kSBV Rev (negative strand)	GCG GGC AGG AAT CTA TGT GGA

- Real time PCR을 이용한 진단: PCR을 이용하여 제작된 cDNA를 증폭시켜 발현되는 kSBV의 양을 확인하였다. PCR의 조건은 기본조건 표 18-13로 진행을 하며, 각기 특이 primer 표 18-12를 사용하여 PCR을 진행하였다.

표 18-13. PCR 조건

pre-Denaturation	94 $^{\circ}\text{C}$	10min	1 cycle
Denaturation	94 $^{\circ}\text{C}$	15sec	35cycle
Annealing	59 $^{\circ}\text{C}$		
Extension	72 $^{\circ}\text{C}$		

- PCR의 전기영동 및 Real time PCR 결과: flitleration을 완료한 kSBV 감염시료는 각각의 Positive strand (lane 1), Negatvie strand (lane 2) 모두 존재하는 것을 확인하였다 (lane p : positive strand (kSBV Clone), Lane N: no template)(그림 18-25).
- Real time PCR을 통하여 확보된 kSBV 시료의 Positive strand 및 negative strand의 정량값을 확인해본 결과, 본 시료에서는 total 1.83E+13 copy의 kSBV Positive strand가 확인이 되었으며, 4.96E+10 copy의 negative strand의 값이 확인이 되었다(표 18-14)..
- 본 시료의 경우에는 순수 virus Isolation이 진행된 시료가 아니므로, viral replication에 관여하는 kSBV의 Negative strand의 존재량이 확인이 되었다.

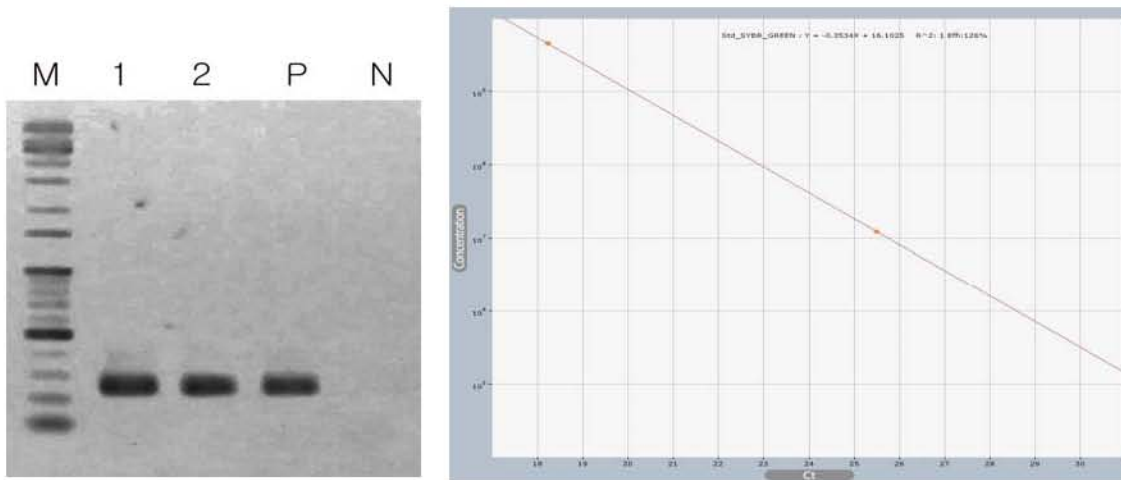


그림 18-25. kSBV 정량진단의 standard curve 및 시료의 정량 값

표 18-14 real time PCR의 값을 이용한 실제 시료의 정량 값

Sample name	filtration 후 용액의 양	positive strand concentration / all sample	negative strand concentration / all sample	positive strand concentration / 1 μ l kSBV Sample	negative strand concentration / 1 μ l kSBV Sample
kSBV 0.5g	300ul	1.83E+13 copy	4.96E+10 copy	6.10E+10 copy	1.65E+08 copy

- Real time PCR을 이용한 kSBV 감염 시료 0.5 g의 정량측정 결과, negative strand의 경우 4.96E+09, positive strand의 경우에는 1.83E+12의 정량 값으로 존재한다는 것을 확인하였다.
- 따라서 최종 filtration과정을 거친 시료에서의 정량값은 negative strand의 경우 1.65E+08 copy/ μ l, positive strand의 경우에는 6.10E+10 copy/ μ l의 양이 존재하는 것으로 확인되었다.

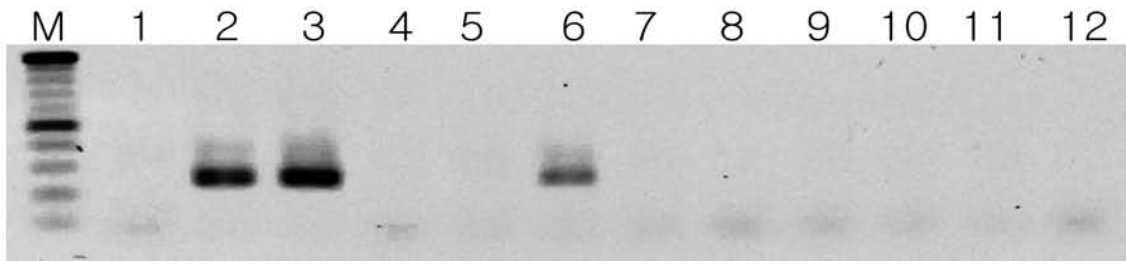
다. 꿀벌-유래세포에 kSBV 접종 및 배양액에서 kSBV 유전자의 발현 확인

- 접종: 분리된 꿀벌유래세포를 각각의 24-well에 3 x 10⁴개의 세포가 되도록 넣어준 후 24시간 배양하였다. kSBV를 각각 0, 3, 10 μ l씩 넣어 접종시키고, 4, 8, 12, 16일마다 상등액을 수거하여 실험에 사용하였다.
- RNA의 분리: 상등액 10 μ l를 사용하여 RNA추출하였으며, RNA의 추출은 TaKaRa사의 RNAiso Plus를 사용하였다. RNA의 추출법은 회사에서 제시한 실험법을 따랐으며 최종 추출된 RNA는 total 50 μ l이었다.

- cDNA 합성: 본 실험에서는 배양액에서 kSBV 유전자의 positive strand와 negative strand를 확인하는 것이 목표이기 때문에 cDNA 합성 시 사용되는 primer를 forward (positive strand)와 reverse (negative strand) primer 표 18-12를 20 pmole씩 투입한 뒤 합성을 진행하였다. cDNA 합성은 RNA (5 μ l)와 20 pmole의 primer를 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 합성하고 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA 합성을 진행시키며, 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하여 RTase의 활성을 없앴다.
- Real time PCR : kSBV에 대한 primer 표 18-12를 사용하여 Real-Time PCR을 진행하였다. PCR 조건은 표 18-13와 같고 결과는 그림 18-26과 18-27에 나타내었다.

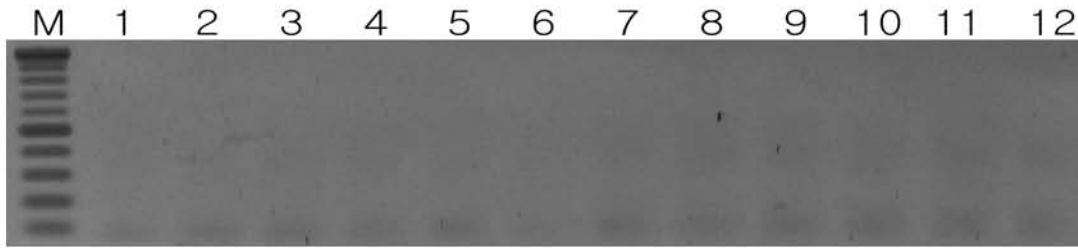
표 18-13 . PCR 조건

pre-Denaturation	94 $^{\circ}$ C	5min	1 cycle
Denaturation	94 $^{\circ}$ C	15sec	35cycle
Annealing	54 $^{\circ}$ C		
Extension	72 $^{\circ}$ C		
Melting analysis	60~90 $^{\circ}$ C		



Lane	접종시간 (일)	kSBV 접종량 (μ l)	Ct	kSBV positive strand copies	Tm
1		0	27.46	9.38E+04	75.5
2	4	3	21.94	3.61E+07	82.
3		10	22.07	3.14E+07	82.
4		0	28.62	2.69E+04	74.5
5	8	3	27.69	7.32E+04	82.
6		10	25.74	6.00E+05	82.
7		0	27.93	5.65E+04	74.5
8	10	3	21.82	4.11E+07	75.5
9		10	22.86	1.34E+07	75.5
10		0	27.74	6.94E+04	74.5
11	16	3	28.29	3.83E+04	74.5
12		10	22.59	1.79E+07	75.5

그림 18-26. kSBV 접종 세포배양액 positive strand에 대한 PCR 결과



Lane	접종시간(일)	kSBV 접종량 (μ l)	Ct	kSBV negative strand copies	Tm
1		0	29.44	1.11E+04	-
2	4	3	27.56	8.42E+04	74.5
3		10	28.46	3.19E+04	74.5
4		0	28.46	3.19E+04	74.5
5	8	3	28.20	4.22E+04	75.
6		10	28.40	3.40E+04	75.
7		0	25.33	9.33E+05	75.5
8	10	3	28.35	3.59E+04	74.5
9		10	28.39	3.44E+04	75.
10		0	28.30	3.79E+04	74.5
11	16	3	29.00	1.78E+04	74.5
12		10	27.81	6.43E+04	75.

그림 18-27. 각각의 시료에 대한 Negative strand에 대한 PCR 결과

- 실험 결과 4, 8일까지 바이러스를 3 μ l를 투여한 세포와 10 ul 투여한 세포에서 kSBV의 positive strand 가 확인이 되었다. 하지만 정량적인 결과를 확인해 봤을 때, 투여한 kSBV가 존재하는 것으로 보이나, 점차 그 양이 감소하고 있는 추세를 확인하였다.
- 또한 동시에 진단을 진행했던 negative strand의 경우에는 모든 샘플에서 진단이 되지 않은 것을 확인을 하였다.
- 따라서 배양액에서 kSBV의 발현량을 확인하기는 어렵다고 판단되며, 세포내부에서 kSBV의 발현을 확인해 보는 것이 적절할 것으로 판단하였다.

라. kSBV의 도메인 분석 및 primer 제작

- kSBV 접종 후 합성되어 외부로 방출되는 바이러스의 양이 적거나 합성시간이 짧은 것으로 생각되어 세포 내부에서 합성되는 바이러스 양을 확인하고자 하였다.
- 세포에서 kSBV의 발현 확인을 좀더 폭넓게 확인하기 위해, kSBV의 모든 단백질에 대한 유전자의 발현을 확인하고자 kSBV의 도메인을 분석하였다(그림 18-28).
- 각각의 도메인별 유전자 서열을 대상으로 그림 18-29 real time PCR primer를 제작하였다(표 18-15).

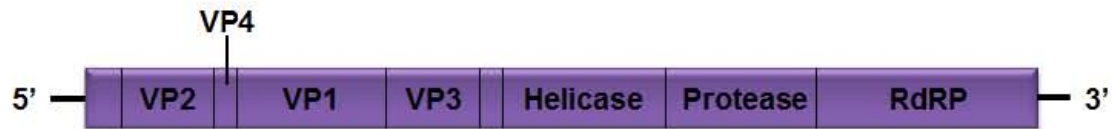
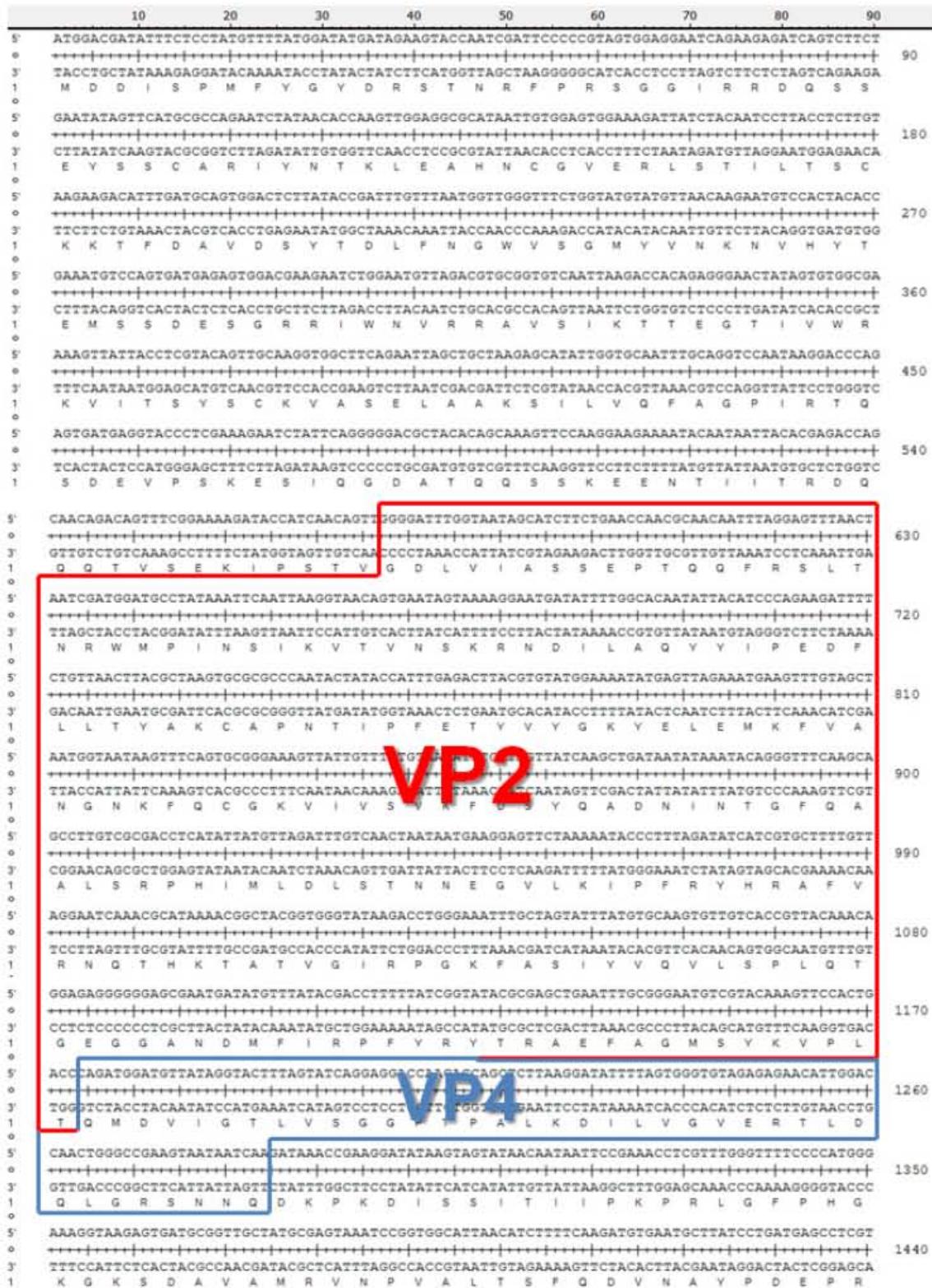


그림 18-28. kSBV 유전자



5' TCTAACTTTTATGGGCCACCGACTGTTAAGACGAATGATTGGAATACGCATTCTCTGATGAGCATGCGCGAGTTTACAGTGGATGATAGT
 2970
 3' AGATTGAAATACCCGGTGGCTGACAACTTCTGCTTACTAACCTTTATGCGTAAGAGACTACTCGTACGGCTCAAGTCTACCTACTATCA
 S N F Y G P P T V K T N D W K Y A F S D E H A R V Q M D D S
 5' ACAGAAAGAGTATACGATGAAGGAACCAGGTGTTAATGCGTAAAGCCAGAGGGTTTAGTTTGAACAAATGTACGGACTTCG
 3060
 3' TGTCITTCATATGCTACTTCCCTTTGGTCCACATGAAAGCCGGGATTTCGGTCTCCCAAATCAAACCTGTTACATGCGTGAAGC
 T E R V Y D E G N Q V Y T A A G C K P E G F S L N N V R T S
 5' GTTAGTACGTTGTGTAATATGCTCGGAAAAGTAGTAACTCCTGAGCGCGCAATGAAAACAGCGTTGTGCGCAACTCCCTATTTGGGTCA
 3150
 3' CAATCATGCAACACATATACGAGCCTTTTCATCATTGAGGACTCGCGGTTACTTTTGTGCAACACGCGTTGAGGGATAAAACCCAGT
 V S T L C N M L G K V V T P E R A M K T A L C A T P Y F G S
 5' GCTTATATGACAGCTACTACACTTGATGCTATAGGCAGTATGCAACACCCGTTACGGGAGCAGCACACCAGTTGACGGCATCTGTTGAT
 3240
 3' CGAATATACTGTCGATGATGTAACACTACGATATCCGTCATACGTCCTTGTGGCAATGCCCTCGTCTGTTGGTCCACTGCCGTAGACAATA
 A Y M T A T T L D A I G S M Q N T V T G A A H Q L T A S V D
 5' GCGAGGTTAGAGCAATTTGTCAGCTAAGTTTGGAGATTCTATTGACGTAATTAACACAGCAGTTAAGGAGGCTATAGGAAAAATGCTTCT
 3330
 3' CGCTCCAATCTCGTAAACAGTCGATTCAAAACCTCTAAGATAACTGCATTAATGATGTCGTAATCCCTCCGATATCCCTTTTACAGAAGA
 A R L E Q L S A K F G D S I D V I T T A V K E A I G K M S S
 5' GGTATGTTTAAACATGGTCAATTACACTGGTACTGTATAGACGTGATATTGGACATATTAGTGGCTTGGATTGATCGAAGTTGGACTGCA
 3420
 3' CCATACAAATGTACCAGTTAATGTGACCAATGACATATCTGCATATAACCTGTATAATACCGAACTAAGTACTCAACCTGACGT
 G M F N M V N Y T G Y C I D V I L D I L V A W I D R S W T A
 5' GTTGGAGTAGGAATTTATCGATTTTGTGACCAAGGTTTGGGGTTGGGTGCAATTTCTAAAGTTATGAATATGGCTACGACTTTTGGGCAA
 3510
 3' CAACCTCATCCCTAATAAGCTAAACACTGGTTCACAAACCCCAACCCAGTTAAAGATTCAATACTTATACCGATGCTGAAAACCCGTT
 V G V G I I R F V T K V L G L G A I S K V M N M A T T F G Q
 5' CTTATAGCTAGGGTTTATGAGCCTCCACGCCAGTTGTGCAAGCACCACCTCCACAGAAGCTACGTTGACTGGAGCTCTGGCAGGTATA
 3600
 3' GAATATCGATCCAAACTCGGAGGTGCGGGTCAACACGTTCTGTTGGAGGGTGTCTTCGATGCAACTGACCTCGAGACCGTCCATAT
 L I A R V Y E P P R P V V Q A P P P T E A T L T G A L A G I
 5' TTGGGTACGCTTATGGGGTTTACATATCACCGTTGCTGGAAGGAGCTACTTTAAGAACITTAATGCTGAGGATGACTAGTTCGGCTGGG
 3690
 3' AACCCATGCGAATACCCCAATGTATAGTGGCAACAGACCTCCCTCGATGAAATCTTGAATTACGACTCCCTACTGATCAAGCCGACCC
 L G T L M G V Y I S P L S G G S Y F K N L M L R M T S S A G
 5' CCCTCTTATCTAGTGGGGTCTTACGTTTTTGTGAGGCGACTTTCAATACGGTAAAGGATATGACATTAATGCTTTGGGTTACGTTTCT
 3780
 3' GGGAGAATAGATCACCCCAAGTGAACAGCGGAGTAAAGTAACTGATCTGTAATTTACGAAACCCAAATGCAAGA
 P S Y L V G V L R A A G C G A T A A G T A A C T L N A L G Y V S
 5' CCAGAGAATGCTGCGGTGAAAATGCTGTGCGGAACATCGGCTACTATACAGAATTTATAACTGATGCTCAGCTTATTACTACAGAAGCT
 3870
 3' GGTCTCTACGACGCGGACTTTTACGACAGCCCTGTAGCCGATGATATGCTTAAAAATTGACTACGAGTCAATAATGATGCTTCGA
 P E N A A L K M L S G T S A T I Q N F I T D A Q L I T T E A
 5' AATGCGCGCTGGTGGACATCCTAGTTTCCGTGCTAAGTACTGGAACACGGTAAATGCAAGCATATCAAATACAGAAGCTATTATTGACT
 3960
 3' TTACGCCGCGACACCCTGTAGGATCAAAGGCACGATTCATGACCTTGTGCCATTACGTTGATAGTTTATGCTTCGATAAATACTGA
 N A A L V G H P S F R A K Y W N T V M Q A Y Q I Q K L L L T
 5' GTTCCTCAGTCTAGTCCCTCTCCAATTTTATCTAGATTTGTTAGTGTATTATACGTAATAGTAAACGAGAAGTTTATTGATATCTCTTCG
 4050
 3' CAAGGAGTCAGATCACGGAGAGGTTAAATAGATCTAACACATCACTACAATATGATTATCATTGCTCTCAAATACTATAGAGAAGC
 V P Q S S A S P I L S R L C S D V I R N S N E K F I D I S S
 5' TCACCGGTGCGTTACGAACTTTTGTGATTTGATTGAGGGTCCAGCTGGTATTGGCAAATCGGAAATAGTGGAAACTCTAGCCTCTGAA
 4140
 3' AGTGGCCACGCAATGCTTGGAAAACACTAAACATAACTCCAGGTCGACCATACCGGTTAGCCTTATCACCTTGAGATCGGAGACTT
 S P V R Y E P F V I C I E G P A G I G K S E I V E T L A S E
 5' TTAAGTAAAGGAGTCAATTTAAAACGACACACAGTGGGGCTACTTATTTTCGAATGCCAGGGTCTCGGTTTTGGTCTGTTATAGAGAT
 4230
 3' AATGACTTTCTCAGTAAATTTTGTGGTGTGTCACCCCGATGAATAAAGCTTACGGTCCAGAGCCAAAACAGACCAATATCTCTA
 L L K G V N L K R P H S G A T Y F R M P G S R F W S G Y R D
 5' CAACCAAGTGGTGGTTTACGACGATTGGGCTAATTTAACGGAACCTCAAGCTTAAATGCAAGAAATTTCCGAAATATACCGCTTAAATCA
 4320
 3' GTTGGTCAACCAATGCTGCTAACCCGATTAATTTGCTGGAGTTCGAAATACGTCGTTAAAGCCTTAATATGGTCAATTTAGT
 Q P V V V Y D D W A N L T E P Q A L M Q Q I S E L Y Q L K S

VP3

Helicase


```

5' TACCAGCATGATGACACTCCTTTGGTAGCTGGGTGTAAGAAACATGAAAAGCTTACTATAGATTTTGGTACTACGAGAGTAGAAAAGTCT
0
3' ATGGTCGTACTACTGTGAGGAAACCATCGACCCACATTCTTTGTACCTTTTGAATGATATCTAAAACCATGATGCTCTCATCTTTCCAG
7200
1' Y Q H D D T P L V A G C K K H G K L T I D F G T T R V E S A
0
5' AAGGAAGCTCTTTGGGATGGGTGGTTATCGAAAATGAAACCCCTTGGTAGTAAAACCCAAAGTTACTAACACCTGAGGAGGCTGCTAGTGGC
7290
0
3' TTCCTTCGAGAAACCTTACCCACCAATAGCTTTTACTTTGGGAACCATCATTTTGGGTTCAATGATGTGGACTCCTCCGACGATCACCG
1' K E A L W D G W L S K M K P L V V K P K L L T P E E A A S G
0
5' TTTCCGTATATACAGTATTATGATCCCATGATTCTCAACACTAGTGCAGGTTTTCTTATGTAGCAACAGAAAAGAAGCGTAAAGAAGAT
7380
0
3' AAAGGACTATATGTCATAACTAGGTTACTAAGAGTTGTGATCACGTCCAAAAGGAATACATCGTTGTCTTTTCTCGCATTCTCTCTA
1' F P D I Q Y Y D P M I L N T S A G F P Y V A T E K K R K E D
0
5' TACATCGTATTTGAGCGCAACGAAAATGAGCAACCTATTGGGGCCACTATAGACCCCGGTGTTTTGGAGGAGATGAAGCGAAAATCCGAG
7470
0
3' ATGTAGCATAAACTCGCGTTGCTTTTACTCGTTGGATAACCCCGGTGATATCTGGGGCCACAAAACCTCCTCTACTTCGCTTTTAGGCTC
1' Y I V F E R N E N E Q P I G A T I D P G V L E E M K R K S E
0
5' TTGAGAAGACAAGGGGTGCAGCCTATTACACCATTTATCGATACACTTAAAGATGAGAGGAAATTACCAGAAAAGTACGAAAAGTATGGT
7560
0
3' AACTCTTCTGTTCCCCACGTCGGATAAATGTGGTAATAAGCTATGTGAATTTCTACTCTCCTTTAATGGTCTTTTTCATGCTTTTCATACCA
1' L R R Q G V Q P I T P F I D T L K D E R K L P E K V R K Y G
0
5' GGAACCTCGAGTATTTTGTAAACCCACCTATTGATTATATTGTGTCGATGAGGCAATATTATATGCACCTTGTGGCCGCAATTATGGAACAG
7650
0
3' CCTTGAGCTCATAAAACATTGGTGGATAACTAATAACACAGCTACTCCGTTATAATATACGTGAAACACCGCGTAAATACCTTGTG
1' G T R V F C N P P I D Y I V S M R Q Y Y M H F V A A F M E Q
0
5' CGTTTTAAATTAATGCATCGAGTGGGGATTAATGTGCAAAAGTACAGAATGGACCCCTTGGCTTCTAAGTTGCTTGCAGAAAGAAAATAAC
7740
0
3' GCAAAATTTAATACGTACGTACCCCTAATTACACGTTTCATGCTTACCTGGGAGAACCAGAGATTCACGAAACGCTTTCCCTTTATTC
1' R F K L M H A V G I N V S T E L L A S K L L A K G N N
0
5' ATTTGTAATATTGACTATTCAAATTTCCGGTCCAGGTTAAAGCAAGGCTGCTGCTGGAATTAATGGTGGGTTGACAAATC
7830
0
3' TAAACATGTAACACTGATAAGTTTAAAGCCAGGTCCAAATACGAGTTTATCGTTCCGACGATACCTTAATTACCACGCCACCTGTTAC
1' I C T I D Y S N F G P G F N A Q I A K A A M E L M V R W T M
0
5' GAGCATGTGGAGGGTGTAAATGAGATAGAAGCAAAACACTTTGTTACATGAGTGTCTTAAATTCAGTTCACCTAGTATCTAATACATTGTAC
7920
0
3' CTCGTACACCTCCACATTTACTCTATCTCGTTTGTGAAACAAATGTACTCACGAAATTAAGTCAAGTGAATCATAGATTATGTAAGATC
1' E H V E C G V N E I E A N T L L H E C L N S V H L V S N T L Y
0
5' CAACAGAAGTGTGGGTCACTAGTGGAGGCCCATACCAGTTGTGATAAATACTTTGGTTAATATTTTATATATTTTCGTAGCTTGGGAG
8010
0
3' GTTGTCTCACACCCAGTGGATCACCTCCGCGGTAATGGCAACACTTTTATGAAACCAATATAAAATATATAAAGCATCGAACCCCTC
1' Q Q K C G S P S G A C P I T V V I N T L V N I L Y I F V A W E
0
5' ACGCTAGTAGAAGTAAAGAAAGAGGGCAAATGTGGAAATTTTTAAACAAAATGTAGAATTGTTCTGCTATGGTGTGATTTGATAATC
8100
0
3' TCGATCATCCCTCATTCTCTCCCGTTTACACCCCTTAAAAAATTTGTTTACATCTTAAACAGACGATACCACCTACTAAGCTATTAAC
1' T L V G S K E R G Q M W E I F K Q N V E L F C Y G D D L I M
0
5' TCAAGTAAACAGATAAGTATAAGGATACTTTTAAATGCATTGACAATAAGTCAATTTTTAGCACAAATATGGCATAAGTGGCAACTGATGCGAAC
8190
0
3' AGTCATTGTCTATTTCATATTCCTATGAAAATACGTAACGTTTATTCAGTTAAAAAATCGTGTATACCGTATCACCGTTGACTACCGTTG
1' S V T D K Y K D T F N A L T I S Q F L A Q Y G I V A T D A N
0
5' AAAGGAGAGGAAGTTAAAGCTTATACGACGTTGTTAATAGTACGTTTTTAAACATGGGTTTCCGTCCCCACGAAATATCCACATTTG
8280
0
3' TTTCCCTCCTTCAATTTTGAATATGCTGCAACAATTTATCATGCAAAAATTTGTACCCAAAGCAGGGGTGCTTCATATAGGTGTAAC
1' K G E E V K A Y T T L L N S T F L K H G F R P H E V Y P H L
0
5' TGGCAGTCTCGCGTACCTTGGAGTTCTATTAATGATACCACTCAATGGATATGGGAATGTGCTGATTTAAAGCTGGCTACTAGAGAAAAT
8370
0
3' ACCGTCAGACCGCATCGAACCTCAAGATAATTACTATGGTGAATACCTATACCCCTTACACGACTAAATTCGACCGATGATCTCTTTTA
1' W Q S A L A W S S I N D T T Q W I W E C A D L K L A T R E N
0
5' TGTCGAGCTGCCCTGTATCAAGCGCACGGTCATGGAAGCCTTGTTTATAATAGATTTAAACAGCAAGTAAATAAAGCATTAGTTAAGCGG
8460
0
3' ACAGCTCGACGGGACATAGTTCCGCTGCCAGTACCTTCGCAACAAATATTATCTAAATTTGTGCTTATTATTTCGTAATCAATTCGCC
1' C R A A L Y Q A H G H G S V V Y N R F K Q Q V N K A L V K R
0
5' AAAATACAGCCAAATGCTTTATCTTTGAAAAGAAAATGATGATTTATTTTATCCCGAAATAGTTATTAG
8529
0
3' TTTTATGTCGGTTAACGAAATAGAACCTTTCTTAACTACTAAATAAATAAGGCTTTAATCAATAATC
1' K I Q P I A L S W K E I D D L F Y P E I S Y

```

그림 18-29 kSBV단백질의 각 도메인별 유전자 서열

표 18-15 kSBV real-time PCR primer

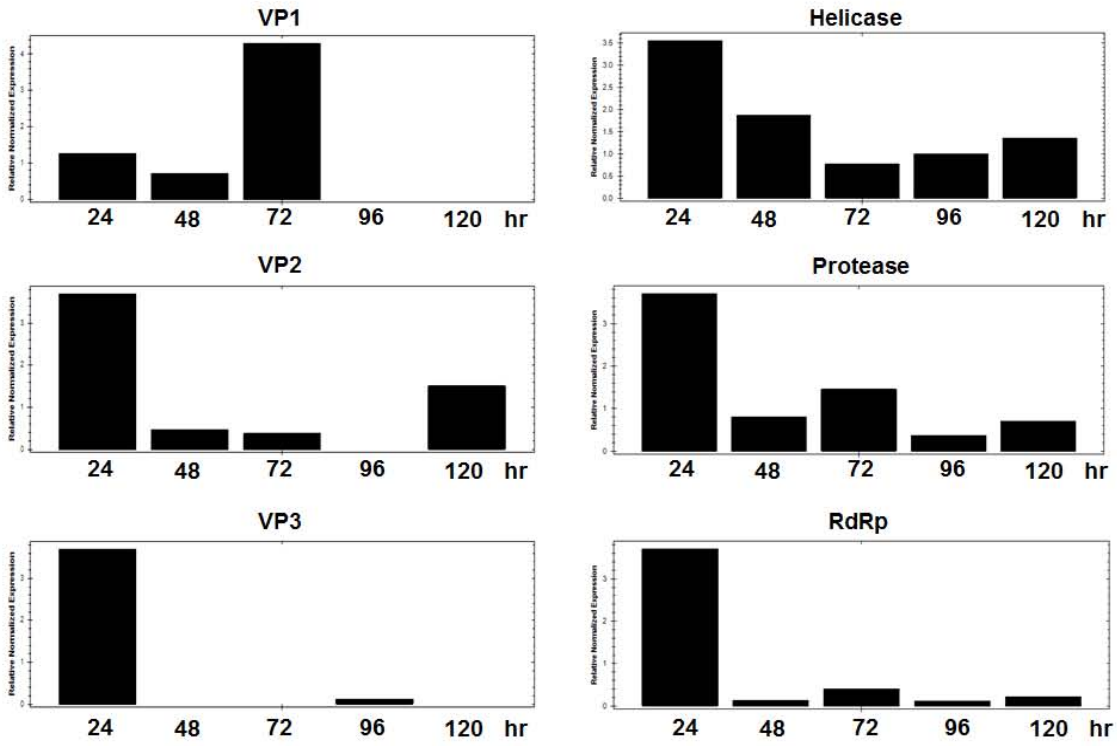
Primer name	Fwd/Rev	5' → 3'
VP2	Fwd	<i>CCT TGT CGC GAC CTC ATA TT</i>
	Rev	<i>GCC GTT TTA TGC GTT TGA TT</i>
VP1	Fwd	<i>CGG CTA GTG CCT ATT TAC CG</i>
	Rev	<i>AGG CAA CAG GCC TTA AAA CA</i>
VP3	Fwd	<i>GAA GCT GGG GAT GAT TTT GA</i>
	Rev	<i>CAC CTG GTT TCC TTC ATC GT</i>
Helicase	Fwd	<i>GGC AAA TCG GAA ATA GTG GA</i>
	Rev	<i>GAC CCT GGC ATT CGA AAA TA</i>
Protease	Fwd	<i>GTA CCC AAC GGG GGA ACT AT</i>
	Rev	<i>CCT TAT ACC GTT GGG CAA AA</i>
RdRP	Fwd	<i>GAT TGG GAA GGA CCC AGT TT</i>
	Rev	<i>TTC TTG GGG AGG TAG GGA GT</i>
<i>b-actin</i>	Fwd	<i>AGG AAT GGA AGC TTG CGG TA</i>
	Rev	<i>AAT TTT CAT GGT GGA TGG TGC</i>

마. 꿀벌유래세포에서의 kSBV 접종 조건 확립

(1) kSBV 12시간 접종 후 배양액 회수

- 접종: 1일된 꿀벌 알 유래 세포와 2 ~ 3일된 꿀벌 larva 유래 세포를 분리하여 각각의 세포를 24 well에 3×10^4 가 되도록 넣어준 후, 24시간 배양하였다. kSBV (3 μ l) 접종 12시간 후 배지를 새것으로 교체해 주고 24, 48, 72, 96, 120 시간에 각각의 세포를 회수하여 kSBV의 세포내 발현 정도를 real time PCR을 통해 확인하였다.
- 각각의 세포로부터 앞서 언급한 방법대로 RNA을 분리하고 cDNA를 추출하여 Real time PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머를 사용하여 각각의 단백질의 발현 양상을 확인하였다(그림 18-30).

A



B

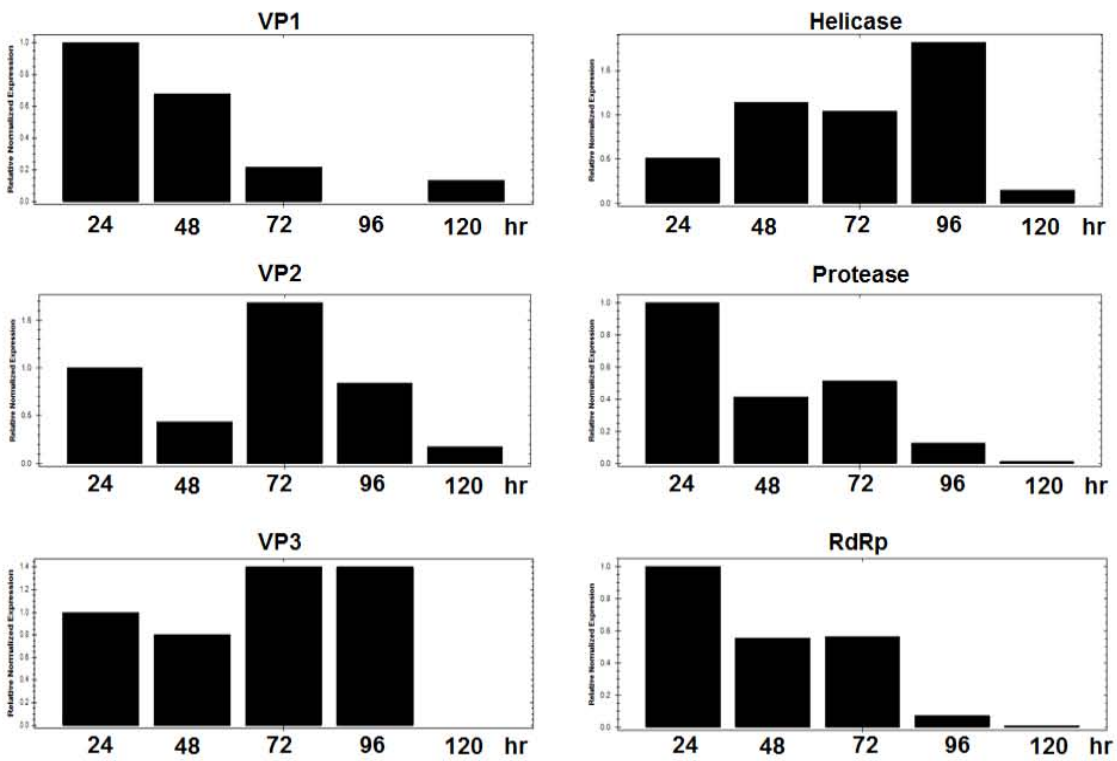


그림 18-30 Real time PCR을 통한 꿀벌유래세포에서의 kSBV 접종 후 합성 확인

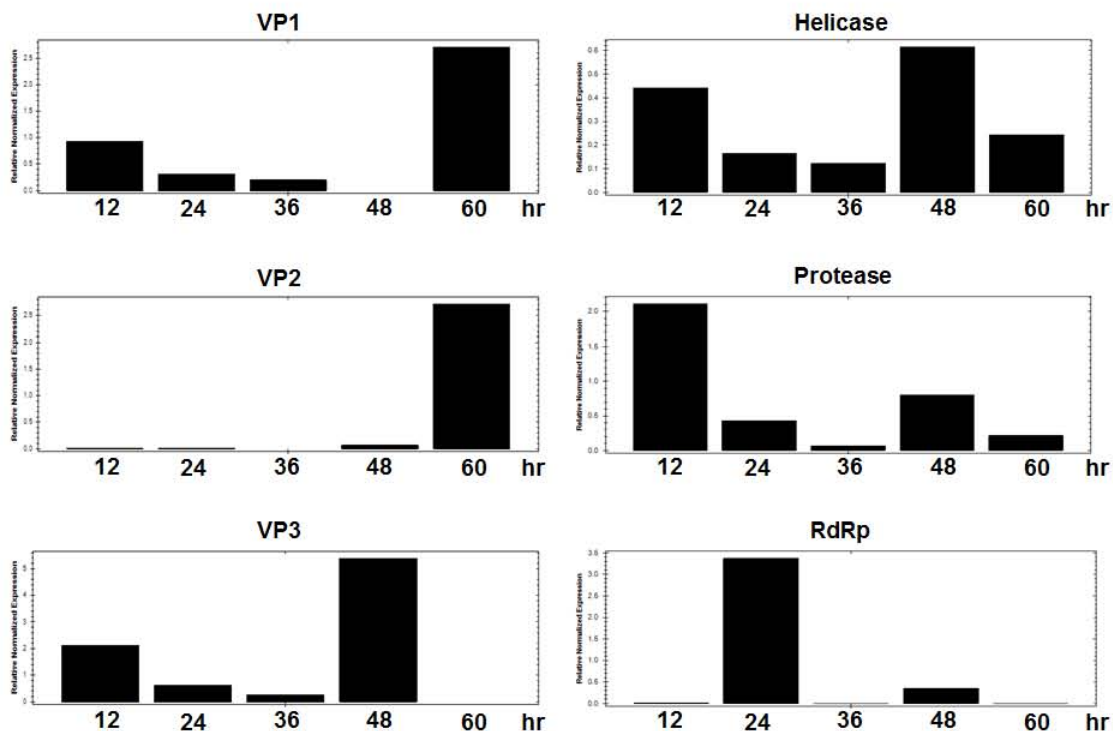
A. 1일차 꿀벌 알 유래세포 B. 2~3일차 꿀벌 larva 유래세포

- kSBV 접종 12시간 후 샘플 회수 조건결과, 접종 시간이 경과 할수록 발현양이 점차 감소함을 확인하였다. 세포 환경에서 12시간 접종 조건은 합성하기에는 매우 짧은 시간임을 확인하고 접종 시간을 늘려 실험을 진행하였다.

(2) kSBV 48시간 접종 후 배양액 회수

- 접종: 1일된 꿀벌 알 유래 세포와 2~3일된 꿀벌 larva 유래 세포를 분리하고 분리된 꿀벌 유래세포를 각각의 24 well에 3×10^4 가 되도록 넣어준 후 24시간 배양하였다. 48시간 접종 후 배지를 교체해 주고 12, 24, 36, 48, 60, 72 시간에 샘플을 회수하여 실험을 진행하였다.
- 위의 방법으로 RNA를 분리하고 cDNA를 추출하여 Real time PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머를 사용하여 발현 양상을 확인하였다(그림 18-31).

A



B

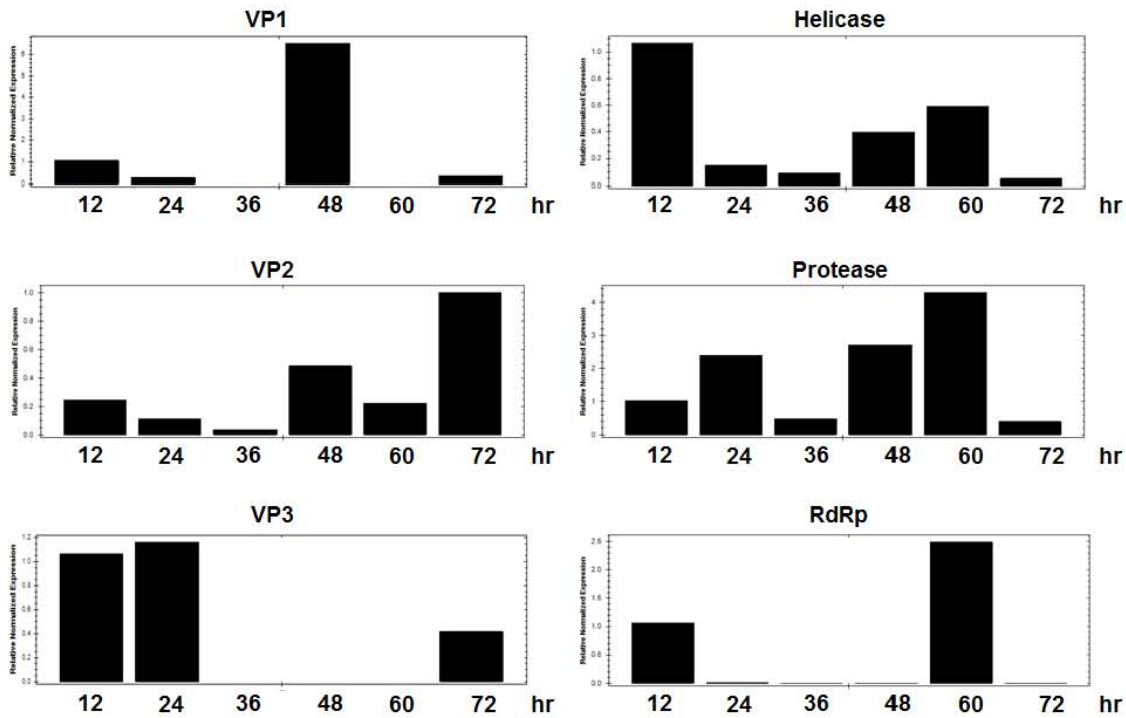


그림 18-31 Real time PCR을 통한 꿀벌유래세포에서의 kSBV 접종 후 합성 확인

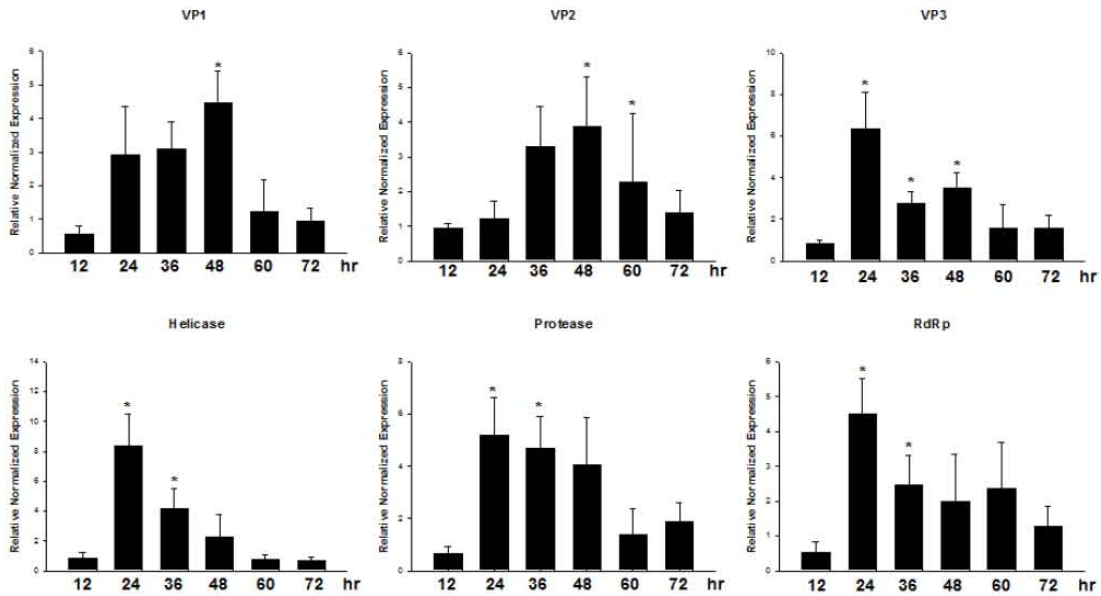
A. 1일차 꿀벌 알 유래세포 B. 2~3일차 꿀벌 알 유래세포

- kSBV 접종 48시간 후 샘플 회수 조건결과 12시간 접종과 마찬가지로 접종 시간이 경과 할수록 발현양이 점차 감소함을 확인하였다.
- 샘플회수 후 잔존할 kSBV로 인해 접종 후 배지를 교체 하였지만 배지 교체 후 세포 내부에서의 합성이 일어나지 않은 것으로 판단하였다.
- 따라서 접종 후 배양액을 잔류시켜 지속적으로 세포내부로 바이러스가 감염될 수 있는 방법을 다음과 같이 고안하였다.

(2) kSBV 접종 후 배양액 잔류

- 접종: 1일된 꿀벌 알 유래 세포와 2~3일된 꿀벌 larva 유래 세포를 분리하고 각각의 세포를 24 well에 3×10^4 이 되도록 넣어준 후 24시간 배양하였다. 각각 $3 \mu\text{l}$ 의 kSBV를 접종 후 12, 24, 36, 48, 60, 72 시간에 세포를 회수하고 분쇄한 후 kSBV의 발현 여부를 확인하였다.
- 세포로부터 위의 방법을 사용하여 RNA를 분리하고 cDNA를 추출하여 Real time PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머를 사용하여 발현 양상을 확인하였다(그림 18-32).

A



B

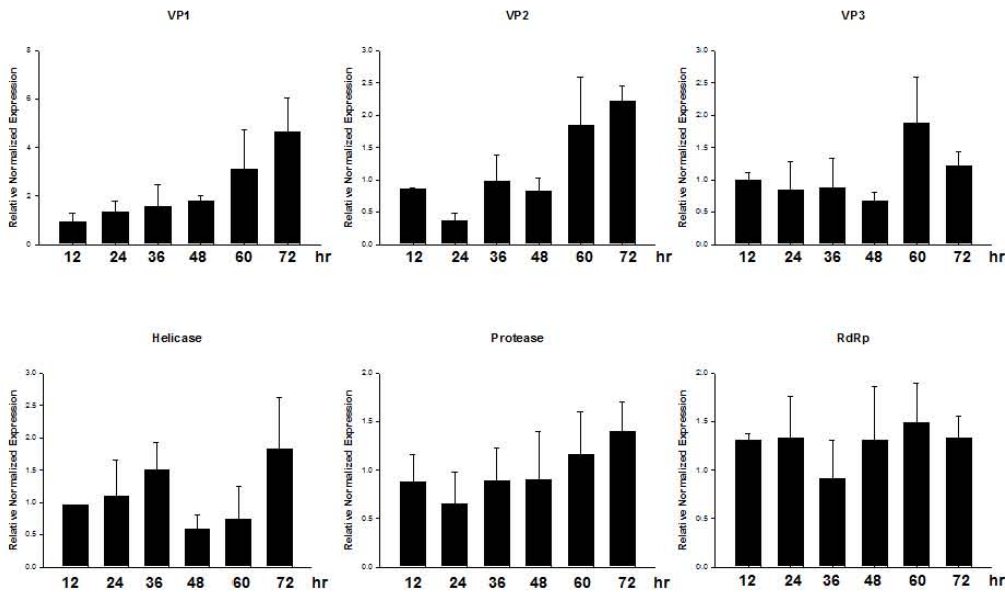


그림 18-32 Real time PCR을 통한 꿀벌유래세포에서의 kSBV 접종 후 합성 확인

A. 1일차 꿀벌 알 유래세포 B. 2~3일차 꿀벌 알 유래세포 * p<0.05

- kSBV 접종 시간이 경과할수록 1일차 꿀벌 알 유래세포에서는 세포내부의 kSBV 각각의 도메인의 발현이 증가하다가 감소하는 양상이 보였으며, 2~3일차에는 큰 폭의 증가현상을 관찰할 수 없었다.
- 따라서 1일차 꿀벌 알에서 유래한 세포가 kSBV가 증식하기 좋은 조건임을 알 수 있었다.

제 19 절 꿀벌 유충을 이용한 병원체 감염법 및 약제 저항성 검사

1. 꿀벌 유충에 대한 정량적 병원체 감염법 개발

가. 꿀벌유충 단위에 의한 정량적 병원체 감염법

종전 꿀벌에 대한 약제의 저항성/감수성의 실험은 봉군(1여왕벌+수만의 일벌) 단위로 진행될 수 밖에 없었으며, 결과의 판정도 봉군단위로만 진행되었다. 이런 대단위 개체들의 집단에 대한 실험은 큰 낭비적 요소와 함께, 기대된 정확성을 얻기 어려웠다.

따라서, 본 연구는 소방(벌집)단위의 실험을 새로이 추구하였으며, 이런 소방 단위의 연구 방법은 꿀벌 질병에 대한 예방 및 치료방법 개발연구의 정밀성에 크게 기여할 것으로 기대하였다.

먼저, 본 연구에서는 60개의 소방을 한 단위로, 또는 30개의 소방을 한 단위로, 감염 및 약제 감수성/저항성의 실험에 사용하였으나, 규격화된 소방의 배열과 봉군의 계절적 변화에 따라 산란권의 크기가 크게 확대/축소되는 점을 감안하여 나름 개선을 추구하게 되었다.



Fig. 19-1. 60 개 소방(cells)의 벌집 단편 (5x12)

먼저, 60 cells (5x12)에서 소방의 폭은 0.5 cm로, 횡축 12개 소방은 거의 정확히 6.0 cm의 크기가 된다. 이 정도의 크기에서 정면의 사진 촬영은 소방내 알의 위치등이 매우 명확하게 드러난다는 장점이 있으며, 이는 순차적 사진 촬영에 의한 영상의 분석에서 매우 명확한 결과를 볼 수 있었다.

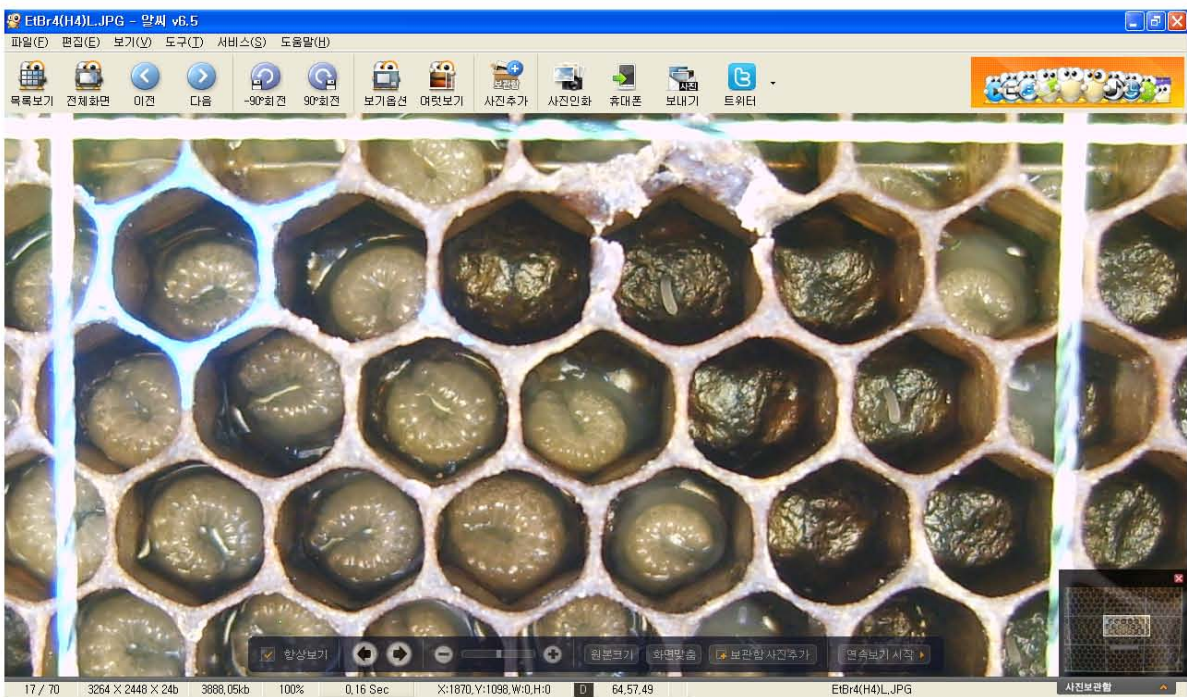
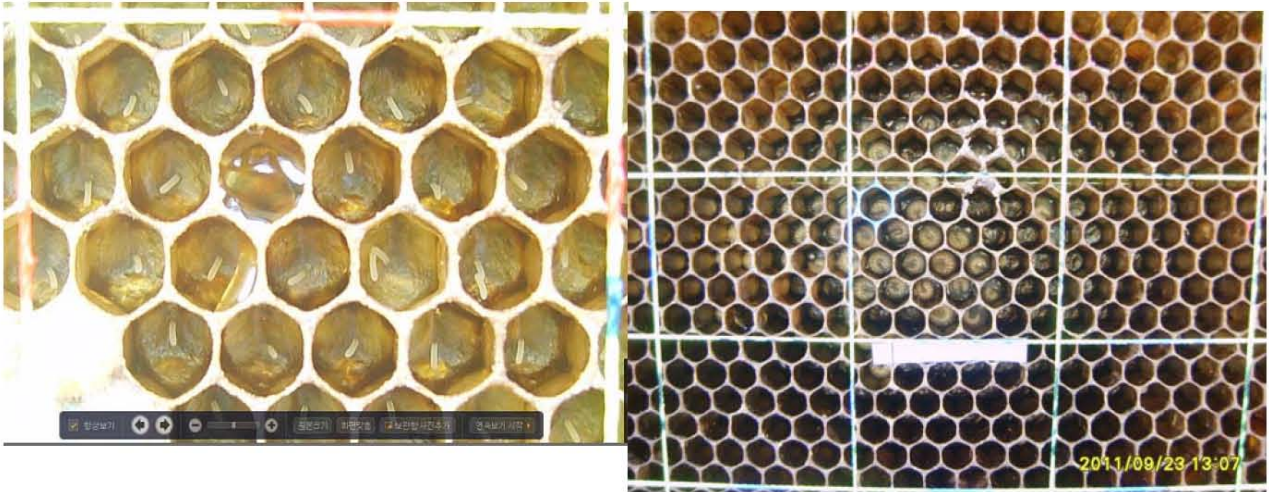







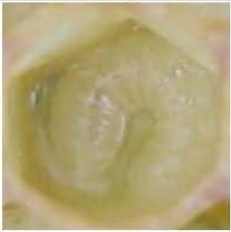




Fig. 19-2. 12행 5열의 30-소방 섹터의 확대사진(좌). 섹터 설치의 영상(우), 병원체 처리 후(하)

여왕봉의 산란 직후 각 섹터의 개별 확대에서 소방내의 egg가 쉽게 관찰되었으며(좌), 병원체 처리 후, 성장하는 유충들은 그 크기에 따라 병해를 입은 것들도 발견되며(하의 우측 일부), 유충 시기에 치사한 것들은 일벌에 의해 제거되고, 그 소방에 새로이 산란된 것이 관찰된다(하의 좌측).

산란 후, 알은 유충의 시기를 거쳐 capping을 하게되며, capping후 pupae로 변태를 하게된다. 이 시기는 유충기의 온도에 따라 크게 지연되기도 하며, 일반적으로 봉군이 충실한 경우, 산란 후 약 10일정에는 대부분 capping이 완료되는 것으로 관찰되었다(Table 19-1).

Table 19-1. A table of larvae days of age

				
1st days : Egg straight standing form	2nd days : Egg inclining of 45°	3rd days : Hatched larvae lying crookedly and being buried to royal jelly	4th days : larvae the arc of two-third circle	5th days : larvae circle, comb-cell' diameter of two-fifth
				
6th days : larvae the half of comb-cell's diameter	7th days : larvae three-fifth of comb-cell's diameter	8th days : larvae four-fifth of comb-cell's diameter	9th days : larvae filled the comb-cell	10th~21th days : pupa

유충에 대한 in vivo 병원체의 감염실험 및 약제후보에 대한 기초 독성 실험은, 2일령의 꿀벌 유충에 대하여, 각 소방당 5 ul의 회석액을 주입하는 것으로 진행되었다.

먼저, *Paenibacillus larvae* strain YJ-21은 cfu 100/5ul/소방을 기준으로 주입되었으며, in vivo 실험의 특성 상 먼저 산란권의 위치를 확인하고, 표적을 설치한 후, 가로 25cm, 세로 15cm 이상의 충분한 산란권이 확보될 경우, 12-multi-pipette을 사용하여, 수직으로 반칸씩 이동하며, 병원체 용액을 주입할 수 있었다. 한편, 세로 축의 산란권이 12cm에 미치지 못 할 경우, 12-multi-pipette을 사용하였으며, 역시 세로축으로 반칸씩 이동하며 병원체 용액을 주입할 수 있었다.

산란권의 가로축이 25cm, 12-multi-pipette을 사용하였을 경우, 1개 소비면 당 최대 1,200개 (100x12)의 소방을 한번의 실험에 사용할 수 있었으며(가로 25cm이면, 세로로 100열), 산란권의 가로축 20cm, 8-multi-pipette을 사용하였을 경우, 세로로 80열을 사용할 수 있기에, 1개 소비면 당 최대 640개 (80x8)의 소방을 실험에 사용할 수 있었다. 전자의 경우, 봉군이 강군이던 산란기 (4월-9월; 중부지방)에 쉽게 발견되는 산란권의 크기이었으나, 비산란기에는 전자 크기의 산란권이 있는 봉군을 발견하기 어려웠다(Fig. 19-3).



Fig. 19-3. 8-channel multi-pipette을 사용한 80열, 총 640개체의 실험 결과.

8-multi-pipette은 세로로 8개 소방에 간격의 조정없이 정확히 일치되며, 이후의 multi-pipetting은 반칸씩 우측으로 이동하며 처리되었다. 처리군은 거의 사멸된 것이며, 처리군의 상단부 좌, 우측에 인위적으로 설치한 위치표지가 환형으로 보인다. 실험군의 상부에 4칸마다 유충을 치사시켜 표지하였으며, 이 4칸은 종열로 8열에 이르고, 일반적으로 이 구간, 즉 64소방을 1개 실험군으로 사용하였다. 이 사진은 처리량 파다로 90%의 유충이 사멸한 상황을 보여준다. 산란권 중 실험군이 아닌 부분은 그 capping을 계수하여 실험의 처리 기준으로 삼았다.



Fig. 19-4. 미국부저병 감염실험에서 질병 전파에 의한 산란권의 전멸.

*Paenibacillus larvae*의 포자는 균주마다 감염력이 매우 상이한 것으로 나타났으며, 감염실험에 유용한 중간 정도의 전파력을 가진 균주의 확보가 매우 중요하였다. SJ-19균주는 상당한 감염력을 발휘하여 소량을 처리하더라도 쉽게 발병되며, 발병후 전 산란권을 쉽게 전멸시켰다. 산란권의 상단부에 위치시켰던 위치표지만 상단 좌우로 보일 뿐, 전 산란권의 유충이 전멸하였다.



Fig. 19-5. kSBV의 서양종 꿀벌에 대한 감염실험.

kSBV는 매우 높은 농도로 처리한 일부 유충을 사멸케 하였으며, 대부분의 서양종 꿀벌 유충에 대하여 발병을 일으키지 못하는 것을 증명하였다. 본 실험은 기내배양에 의한 kSBV 인공 감염 실험에서도 입증되었으며, 고농도의 kSBV 섭취는 그유전체를 2-4일령 유충에게 감염되어 유전체의 수가 증가되는 것으로 나타났으나, 이후 그 수는 감소되는 것으로 측정되었다. 본 실험에서도 고농도의 kSBV는 서양종 꿀벌의 유충을 치사시킬 수 있었으나(상단 일부), 대부분 정상적인 capping을 보였고, 대부분 hatching한 것으로 나타났다.



Fig. 19-6. 약제후보의 기초 독성 실험(상, 하)

약제 후보의 독성은 5단계로 약제를 희석하고, 이를 각 단계를 세로 2열 (16소방=8x2)씩 실험 하여 각 약제후보 당 160소방이 사용되었다.



Fig. 19-7. Ascospaera apis의 포자를 사용한 백목병의 정량적 감염실험

LD50을 정하기 위하여 감염량의 정량화를 추구한 것으로 각 소방에 투여된 병원체는 인접 소방으로 즉시 전파되지는 않는 것으로 확인되었다. 이런 결과는 봉군의 강약에 따라 크게 좌우되는 것으로 봉군내 일벌의 청소행동의 강약은 봉군내 위생, 질병에 전파에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다.

2. 꿀벌 유충을 이용한 약제 후보 물질의 일반 독성 검사

가. 한국화학물은행에서 공여한 8287종의 화합물의 꿀벌 유충을 이용한 독성 검사

본 연구는 본 과제의 범위 외의 것으로, 과제의 시작 전에 한국화학물연구소에서 화합물을 공여할 것인지, 비용 등에 관하여 전혀 예측을 못하여, 본 과제에서는 일단 범위 외의 연구로 취급되었다.

이후, 한국화학물연구소에서 공여한 8,277종 화합물은 별도의 계약에 의하여 경기대에 이관되었으며, 이 중 일부의 화합물[U-000801-A03 (ID 47339) 부터 U-000801-H12 (ID 52452)]부터 꿀벌유충에 대한 기초 독성을 검사하게 되었다.

이후, 본 기초독성 실험은 화합물의 종류가 막대한 이유로 실험에 소요되는 꿀벌 유충의 수를 축소하였으며, 한국화학물연구소에서 공여한 8,277종 화합물은 각 5.0 mM 내외의 농도이었기에, 일반적인 larvae에 대한 각 화합물의 투여는 고농도 (50 microM), 1수, 중농도 (5.0 microM), 3수, 저농도 (0.5 microM), 4수, 총 8수에 각각 투여하게 되었다(Fig. 19-7).



Fig. 19-7. larvae in vivo test에 의한 한국화학물은행 화합물에 대한 기초 독성실험. 사진은 Nurse벌들이 이상 또는 사멸된 larvae를 제거하여, capping이 되지않은 소방을 보여주고 있다.

각 화합물의 처리에 따라 기초독성 실험의 결과는, 해당 화합물의 처리에도 불구하고 모두 생존하였을 경우(capping되었을 경우), 고1/1, 중3/3, 저4/4로 정리되었으며, capping된 개체(개별 소방)이 hatching되지 아니하였을 경우, 상기의 예에서 저농도 4개의 capping 중 2개가 hatching되지 아니하였을 경우 고1/1, 중3/3, 저4(2)/4로 기록, 정리하였다.

Table 19-2. 한국화학물 연구소에서 공여한 8,287 종 화합물의 ID 및 농도, volume.(일부 발췌)

No	ID	Position	농도(mM)	Volume(μ l)
1	47339	U-000801-A03	5.3	5
2	50600	U-000801-A04	5.1	5
3	51469	U-000801-A05	5.2	5
4	51626	U-000801-A06	5	5
5	43364	U-000801-A07	5	5
6	45020	U-000801-A08	5.4	5
7	41843	U-000801-A09	5.4	5
8	50644	U-000801-A10	4.7	5
9	51248	U-000801-A11	5.3	5
10	51754	U-000801-A12	5.6	5
11	47170	U-000801-B03	5.4	5
12	50380	U-000801-B04	5.5	5
13	50816	U-000801-B05	5.7	5
14	51570	U-000801-B06	5.5	5
15	49689	U-000801-B07	5.3	5
16	41978	U-000801-B08	5.7	5
17	50217	U-000801-B09	5.3	5
18	50735	U-000801-B10	4.7	5
19	51487	U-000801-B11	5.1	5
20	51481	U-000801-B12	5	5
21	50117	U-000801-C03	4.8	5
22	50492	U-000801-C04	5.6	5
23	51672	U-000801-C05	4.9	5
24	51247	U-000801-C06	5.1	5
25	48904	U-000801-C07	4.8	5
26	41615	U-000801-C08	4.8	5
27	49842	U-000801-C09	5.4	5
28	50950	U-000801-C10	5	5
29	51111	U-000801-C11	4.9	5
30	51770	U-000801-C12	4.9	5
31	50235	U-000801-D03	4.6	5
32	50274	U-000801-D04	4.9	5
33	51229	U-000801-D05	5.4	5
34	51721	U-000801-D06	5.7	5
35	43767	U-000801-D07	5.4	5
36	42050	U-000801-D08	5	5
37	50185	U-000801-D09	4.9	5
38	50425	U-000801-D10	5.4	5
39	51288	U-000801-D11	5.1	5
40	52361	U-000801-D12	5.2	5
41	50945	U-000801-E03	5.3	5
42	50985	U-000801-E04	4.9	5
43	51795	U-000801-E05	5.6	5
44	52134	U-000801-E06	5.6	5
45	44654	U-000801-E07	5.9	5

46	41646	<i>U-000801-E08</i>	5.2	5
47	49960	<i>U-000801-E09</i>	5.3	5
48	50579	<i>U-000801-E10</i>	5.2	5
49	51148	<i>U-000801-E11</i>	5	5
50	52190	<i>U-000801-E12</i>	5.4	5
51	51043	<i>U-000801-F03</i>	5.2	5
52	50941	<i>U-000801-F04</i>	5.3	5
53	51173	<i>U-000801-F05</i>	5.1	5
54	52521	<i>U-000801-F06</i>	5.4	5
55	44333	<i>U-000801-F07</i>	5	5
56	41827	<i>U-000801-F08</i>	4.7	5
57	50312	<i>U-000801-F09</i>	5.4	5
58	50662	<i>U-000801-F10</i>	5.1	5
59	51245	<i>U-000801-F11</i>	4.5	5
60	52057	<i>U-000801-F12</i>	5.4	5
61	50641	<i>U-000801-G03</i>	5.6	5
62	49850	<i>U-000801-G04</i>	5.4	5
63	52301	<i>U-000801-G05</i>	5.1	5
64	48381	<i>U-000801-G06</i>	5	5
65	45096	<i>U-000801-G07</i>	5.4	5
66	50149	<i>U-000801-G08</i>	5.4	5
67	50194	<i>U-000801-G09</i>	5.6	5
68	50968	<i>U-000801-G10</i>	5.4	5
69	51790	<i>U-000801-G11</i>	5.4	5
70	52520	<i>U-000801-G12</i>	5.4	5
71	50956	<i>U-000801-H03</i>	4.7	5
72	50360	<i>U-000801-H04</i>	4.9	5
73	51717	<i>U-000801-H05</i>	5.4	5
74	47494	<i>U-000801-H06</i>	4.9	5
75	45103	<i>U-000801-H07</i>	5.2	5
76	47119	<i>U-000801-H08</i>	4.8	5
77	50564	<i>U-000801-H09</i>	5.5	5
78	51577	<i>U-000801-H10</i>	5.8	5
79	51758	<i>U-000801-H11</i>	5.3	5
80	52452	<i>U-000801-H12</i>	5	5

* 총 8,287종의 화합물 중 Figure 16의 실험에 사용된 보여준 U-000801-A03 부터 U-000801-H12 까지 80종을 표로 정리하였다. 이외의 8,207종을 포함한 총 8,287의 ID는 파일로 보고를 대신하며, 각 ID에 대한 정보는 한국화합물연구소의 홈페이지에서 각기 정보를 얻을 수 있다.

제 20 절 꿀벌 주요 질병에 대한 표준 제어법

1. 낭충봉아부패병(kSBV)에 대한 표준 제어법

가. 진단

낭충봉아부패병(SBV)은 서양종 꿀벌에 대하여 큰 위협은 아닌 것으로 알려져 왔으나, 2010년 이래 한국산 낭충봉아부패병 바이러스 (kSBV; korean Sacbrood Virus)가 국내의 토종에 대하여 강한 감염과 발병을 일으켜, 국내 토종벌 산업의 기반을 흔들고 있다.

토종벌과 서양종 꿀벌에서 이 바이러스가 감염되면, 약한 바이러스의 경우, 인지하지 못하고 넘어갈 수 있으나, 이번 kSBV의 경우, 강한 발병력으로 유충을 치사시켜, 봉군내 일벌이 이를 제거하는 과정에서 봉군내 전파가 일어나는 것으로 파악되고 있다.

kSBV의 강한 감염의 경우, 유충의 사체가 소문의 앞에 다수 버려지는 것으로 인지될 수 있으며, 우선 정확한 진단을 위하여, 본 과제에서 개발된 낭충봉아부패병 검사키트로 양봉인이 직접 검사해 볼 것을 권한다.

나. 낭충봉아부패병 검사키트에 의한 진단

낭충봉아부패병 검사키트는 아래의 설명서(또는 제조사에 따라 약간 다른 설명서)에 따라 양봉인 스스로 이 질병의 감염여부를 검사할 수 있는 키트이다.

KSBV(한국 낭충봉아부패병 원인 바이러스) 검출 테스트 키트 설명서

1. 실험 순서

① 꿀벌 유충 1마리(0.2ml 기준)를 깨끗한 일회용 나무젓가락으로 버피가 들어 있는 튜브에 넣으세요.

* 튜브 눈금에 0.4ml의 버피가 들어 있으며, 유충 1마리를 넣으면 0.5ml 눈금에 가까워집니다.

② 막대로 튜브 안을 누르고 돌려 유충이 완전히 부서지도록 분쇄하세요(이때, 막대는 화살표 부분이 아래로 향하도록 한다).

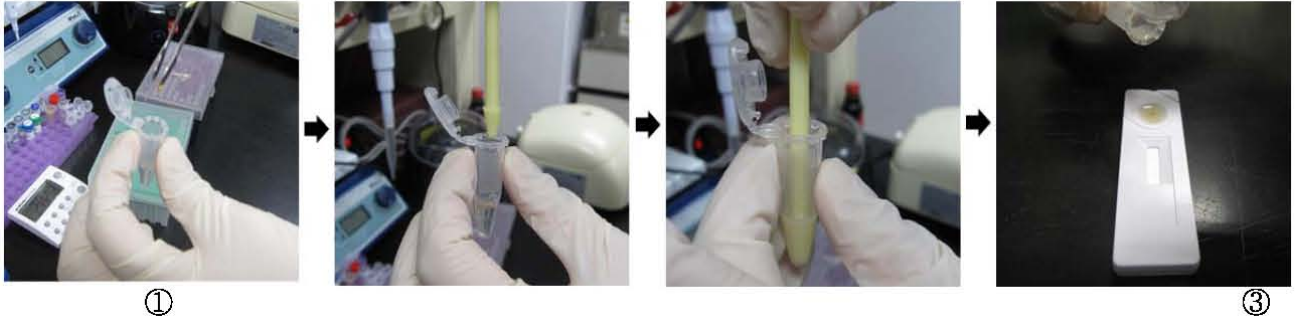
* 분쇄 시간은 약 30초 수준으로, 육안으로 보이는 덩어리가 없는 정도까지 분쇄합니다. 이때, 용액이 튜브 밖으로 나오지 않도록 주의합니다.

③ 튜브 제로 유충과 섞인 버피를 테스트 키트의 오른쪽 샘플창에 넘치지 않을 정도로 떨어뜨리세요.

* 튜브 눈금 0.5ml에 가깝던 용액이 떨어뜨린 후 튜브 0.3ml눈금에 위치하거나, 그 위에 위치합니다.

④ 3번 과정 이후 10분에서 15분 사이에 결과창에 1개의 줄이 나타나는지, 2개의 줄이 나타나는지를 확인하세요. 이 때, 15분이 넘는 시간이 지나면 결과를 명확하게 관찰하기 어려울 수 있습니다.

* 결과 확인을 위한 자세한 사항은 뒷면의 결과 판정 부분을 참고하세요.



①

②

③

<사진으로 보는 실험 순서>

2. 키트 구성품



테스트 키트(Rapid Test Kit)

→ 샘플 창(등근 모서리)

→ 결과 창(각진 모서리)

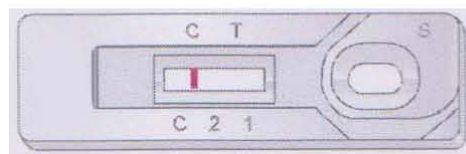
① 테스트 키트(포장 상태)

② 버퍼 (튜브 안에 400 μ l의 버퍼가 들어 있습니다.)

③ 분쇄 막대 (화살표처럼 뾰족한 부분이 밑으로 가게 사용합니다.)

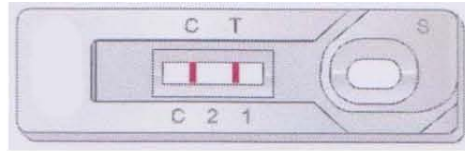
3. 결과 판정

1) 음성 판정 (KSBV가 발견되지 않은 경우)



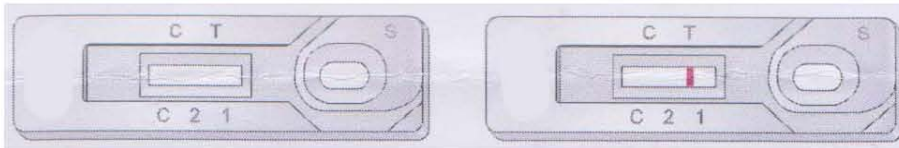
C(Control)쪽에만 선이 나타날 경우, KSBV가 유충에서 발견되지 않았음을 뜻합니다.

2) 양성 판정 (KSBV가 발견된 경우)



T(Test)쪽과 C(Control)쪽 모두 선이 나타날 경우, KSBV가 유충에서 발견되었음을 뜻합니다.

3) 판정 불가 (신뢰할 수 없는 결과일 경우)



C(Control)쪽에 선이 나타나지 않았을 경우, 이 실험 결과는 신뢰할 수 없을 것입니다. 다시 실험하여 결과를 판단해야 합니다.

4. 시료 준비

실험에 사용할 꿀벌 유충은 신선한 죽은 지 얼마 되지 않은 유충이나 KSBV 증상을 보이는 유충, 또는 소문 밖으로 떨어진 유충을 사용하세요.

5. 주의사항

- 습기에 민감하므로, 포장에서 벗겨낸 테스트 키트는 개봉 후 바로 사용하십시오.
- 테스트 키트의 결과창과 샘플창을 만지지 마십시오.

다. 낭충봉아부패병 검사키트에 의한 양성 진단 후 처치

낭충봉아부패병은 대표적 바이러스질병이며, 극복하기 결코 쉽지 않은 질병이다. 봉군을 희생시킬 각오 하에 소각 등을 포함한 철저한 제어법을 시행하여야 하며, 병정의 강약에 따라 적절한 판단을 내려야 할 것이다.

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, 꿀벌응에 구축에 의한 바이러스 매개체의 제거가 필수적이다. 그러나 이들 치료방법 보다는 사양관리의 강화 등 친환경적 방법을 통한 예방이 우선적으로 수행되어야 할 것이다.

(1). 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 추구하며, 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 강균으로 유지시키기를 기대하는 것이다.

한편, 꿀벌의 병원성 바이러스는 수년간 감염력을 유지할 수 있다. 봉군이 강균으로 유지될 때, 바이러스 질병의 징후는 뚜렷하게 나타나지 않으나, 한번 바이러스질병이 발병된 소상과 소비는 바이러스의 원천이기에, 이들을 별도로 관리하여야 하며, 소상은 철저한 소독 후 재사용이 가능하지만, 소비의 재사용은 극히 조심하며, 최종적으로 소각처리하여 바이러스병 전파를 차단시켜야 할 것이다.

(2). 꿀벌응애의 구축에 의한 바이러스성 질병의 극복

꿀벌응애가 다종의 바이러스를 꿀벌 간에 매개시키는 전파자임은 확실히 입증되어 있다. 따라서 꿀벌응애의 구축은 바이러스성 질병의 극복을 위하여 필수적이며 우선적으로 처치하여야 한다.

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.

표 20-1. 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(Armitraz)	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 약제가 잔류하지 않도록 주의하는 것이 매우 중요하다.

(가). 꿀벌응애의 구축을 위한 친환경 생물학적 처치법

① 젖산(Lactic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축

㉞ 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.

㉟ 제법 및 주의점

- 1) 일반적인 공업용 젖산(Lactic acid)은 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 접촉 시 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

㉑ 용법 및 용량

- 1) 60%의 개미산을 사용하여, 가급적 전용 개미산 기화기로 기화량을 조정한다
- 2) 5일간 처치를 계속하면 구축효과를 높일 수 있다.

㉒ 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 접촉 시 즉시 다량의 물로 세척하여야 한다.
- 3) 봉충이 없는 이른 봄에 처리하는 것이 유리하나, 기화된 개미산은 봉개된 소방 안에까지 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 사용하지 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 계속할 수 있으나, 감내할 수준을 넘어서면 즉시 기화기를 제거하고 통풍을 강화시켜 주어야 한다. 소상 내 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, 봉장 내 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 증지를 야기할 수 있기에 주의한다.
- 8) 이는 유럽의 여러 국가에서 사용되는 신뢰성이 있으나, 개미산 기화의 농도조절 실패 등 처치법의 미숙으로 인한 많은 피해사례가 보고되었다.

㉓ 옥살산(Oxalic acid)을 사용한 꿀벌응애의 구축

㉓ 용법 및 용량

- 1) 3.2%의 옥살산당액을 사용하여, 강균은 5 ml, 약균은 3 ml를 소상 내벽 (소비 사이)에 흘려 넣어 준다.
- 2) 봉판이 없는 이른 봄 또는 늦은 가을에 사용하며, 기온이 5°C 이상일때 처리한다.

㉔ 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 별의 발생은 자주 관찰되며, 감내할 수준이라면 처치를 계속할 수 있으나, 감내할 수준을 넘어서면 처치액을 소상 내에서 즉시 제거하고 통풍을 강화시켜 주어야 한다.
- 4) 소상 내 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, 봉장 내 모든 봉군에게 일률적으로 처치하는 것 보다는, 일부 봉군에 처치해 보고, 그 효과를 참고하여 3.2% 옥살산당액의 양을 조절한 후 전체 봉군에 적용하는 조심성이 필요하다.
- 5) 반복적 옥살산의 투여는 여왕벌을 죽이는 수가 있기에, 2회/년(이른 봄, 늦가을)이하로 처치를 제한한다.

㉕ 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 이상일 때 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 20-2. 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 방제효과 외에 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.

(나). 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 20-3. 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(Armitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
마이카트		아미트라즈(Armitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
마이탁		아미트라즈(Armitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
속살판		아미트라즈(Armitraz)	훈연지	0.2 mg/kg
페리진		코마포스(Coumaphos)	액체	0.1 mg/kg
체크마이트		코마포스(Coumaphos)	액체	0.1 mg/kg
플벡스-VA		Bromopropylate	훈연지	-*
바로킬P(Varokil P)		시미아졸(Cymiazole)	분말	-*
아피톨		시미아졸(Cymiazole)	분말	-*
신등전훈연지		Tetradifon	훈연지	-*
다카라		Chlorobenzylate	훈연지	-*
진벌지		Chlorobenzylate	훈연지	-*

* 조사되지 않았다는 뜻이며, 잔류기준이 없다는 것이 아님.

(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 회석액은 소독력이 우수하며, 99.9%이상의 일반 바이러스 제거를 기대할 수 있고, 용량과 용법을 잘 지킬 수 있다면 특별한 잔류성이나 독성을 고려하지 않아도 된다.

락스의 회석은 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(처리 후 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 간편하여야 하며, 주기적인 소독으로 봉군 간 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 충분

하며, 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.

2. 미국부저병(AFB), 유럽부저병(EFB)에 대한 진단 및 처치

가. 진단

미국부저병(American Foulbrood; AFB)은 세균 *Paenibacillus larvae*가 원인균이며, 유럽부저병(European Foulbrood; EFB)은 세균인 *Melissococcus plutonius*가 원인균이다. 전자는 매우 끈적이는 유충사체를 만들며, 후자는 그렇치 않아 소비에서 일벌에 의해 제거되기 쉽고, 인지하지 못하는 경우가 많다.

보통 내검에 의하여 유충의 상태를 보고 인지하게 되나, 소문 앞에서 발견되는 유충이 있는 경우, 우선 정확한 진단을 위하여, 본 과제에서 개발된 미국부저병 검사키트, 유럽부저병 검사키트로 양봉인이 직접 검사해 볼 것을 권한다.

나. 검사키트에 의한 검사

이는 낭충봉아부패병 검사키트와 동일한 원리이며, 검사법도 역시 동일하다. 키트의 포장에 적혀 있는 미국부저병 검사키트 또는 유럽부저병 검사키트임을 확인하고, 내용 중의 설명서에 따라 직접 검사를 수행한다. (해당의 설명을 재수록하지 않음).

다. 검사결과 양성일 경우 처치법

(1). 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 종뿐이며, 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 4주 이내의 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.

(가) 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, 병통의 구석에 넣어 두며, 3일 간격을 두고 3-5회에 걸쳐 가급적 새로이 조제하여 투약한다.

(나) 설탕액으로 조제

200mg의 옥시테트라사이클린(Oxytetracycline)을 30ml 물에 완전히 녹인 후 30g의 설탕을 넣고 설탕사양액으로 조제하며, 1개 봉군에 급여한다. 이는 1개 봉군이 수시간 안에 완전히 소모시키는 양으로, 3일 간격을 두고, 3회-5회, 매번 새로 조제된 것으로 급여한다.

(다) 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.

(라) 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.

(마) 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.

(2). 네오테트라에 의한 세균성 질병의 처치

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.

(3). 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 20cm 이상 깊이로 묻어야 한다.

3. 백묵병(CB), 석고병(SB) 등 병원성 진균에 대한 처치

가. 진균성 질병의 진단

편의상 백묵병(Chalk brood)은 *Ascospaera apis*에 의한 진균성 꿀벌질병이며, 석고병(Stone brood)은 *Aspergillus flavus* 등 *Aspergillus species*에 의한 진균성 꿀벌질병이나, 백색 또는 흑색의 딱딱한 꿀벌 사체를 발견하게 되는 일반 양봉인에게 양자의 구별은 매우 어렵다.

진균성 질병의 발병은 일반적으로 내검에서 딱딱한 유충의 사체를 발견함으로써 인지하게 되며, 이 딱딱한 유충의 사체는 소문 앞에도 버려지게 된다. 따라서, 소문 앞에 유충이 발견되면, 정확한 원인체의 동정을 위하여, 양봉인이 직접, 본 연구에서 개발된 진균성 질병 진단키트를 통한 검사를 수행해 볼 것을 권한다.

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 수밖에 없으며, 사양관리의 강화, 독성 및 잔류성이 낮은 약제의 사용 등 친환경적 방법을 우선으로 하여야 할 것이다.

나. 검사키트에 의한 검사

이는 낭충봉아부패병 검사키트와 동일한 원리이며, 검사법도 역시 동일하다. 키트의 포장에 적혀 있는 백묵병 검사키트 또는 석고병 검사키트임을 확인하고, 내용 중의 설명서에 따라 직접 검사를 수행한다. (해당의 설명을 재수록하지 않음).

다. 검사결과 양성일 경우 처치법

(1). 사양관리에 강화에 의한 진균성 질병의 극복

백목병 등 진균성 꿀벌질병에 대항하는 사양관리의 요점은 강균양성이다. 강균양성은 소비의 축소, 여왕봉의 교체, 합봉, 사양강화 등의 방법으로 추구하며, 이 과정에서 백목병 등에 감염되어 약화 또는 치사된 larvae를 빠르게 배출시키기를 기대하는 것이다. 치사된 larvae는 대량의 백목병균 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 강균으로 유지시키기를 기대하는 것이다.

여왕봉 산란을 억제시키면, 배출되는 백목병 치사체가 감소되어 백목병을 극복한 것으로 오해할 수 있으나, 이는 백목병이 감염될 larvae의 수가 줄어들어 생긴 일시적 현상일 뿐, 봉군전체가 약군으로 전락되는 점에 주의하여야 한다.

한편, 백목병의 포자는 10년 이상 감염력을 유지할 수 있다. 봉군이 강균으로 유지될 때, 백목병의 징후는 뚜렷하게 나타나지 않으나, 한번 백목병이 발병된 소상과 소비는 백목병 포자의 원천이기에, 이들을 별도 관리하여야 하며, 소상은 철저한 소독 후 재사용이 가능하지만, 소비의 재사용은 극히 조심하며, 최종적으로 소각처리하여 백목병 전파를 차단시켜야 할 것이다.

(2). 그 외의 진균성 질병에 대한 약품들

(가) 프로피온산 나트륨

프로피온산(propionic acid) 훈증성 약제는 백목병의 치료제로 다년간 사용되어 왔다. 프로피온산 나트륨은 꿀벌에 대하여 강한 산란억제를 야기하는 성질이 있으며, 산란억제로 인하여 백목병 치사체의 배출이 감소되나, 이는 일시적 현상으로 결국 봉군은 약군으로 전락되는 치명적 약점이 있었다. 물론 백목병의 포자는 잔류되기에, 이런 점을 충분히 고려하여야 할 것이다.

(나) 비넨블(Bienewohl)을 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어

Bienewohl은 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, Bienewohl 용액 1ml 씩을 각 소비사이에 흘려 넣어주는 간단한 것이며, 5°C 이상의 기온에서만 사용한다.

(나) 알보픽스(Albofix) 또는 PWO를 사용한 꿀벌 진균성 질병의 제어

Albofix 그리고 Albio K는 천연 목재의 추출물(목재액)로 일찍이 그 항진균성이 발견되어 많은 식품가공업, 식품제조업의 현장에서 항진균 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, 항진균의 효과를 인정받는 물질이다.

Albofix, AlbioK, Pure Wild Oil 모두 공기 중 확산법에 의하여 백목병의 *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. 항진균제 AlbioK와 Pure Wild Organo Oil을 사용한 꿀벌 백목병의 예방. 한국양봉학회지. 20(1):19-28.

* 이혜민 등, 2003. 항진균제 Albofix에 의한 꿀벌 백목병의 방제와 제어. 한국양봉학회지. 18(2):139-150.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 정성적 목표의 달성도

본 연구의 목적은 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다. 이 목표를 달성하기 위하여, 상기 꿀벌 질병의 치료 및 방제를 위한 효과적인 꿀벌약품들을 탐색 및 개발하고, 꿀벌에 무분별하게 사용되어온 약품 등(미등록 약품 포함)에 대한 표준사용법을 개발하고, 유효한 면역증강 물질을 탐색 및 개발하고자 하였다.

본 연구는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병, 부저병, 및 석고병을 대상으로 하며, 해당 병원체는 각각 바이러스인 SBV, 세균인 *Paenibacillus larvae*, 진균인 *Ascosphaera apis* 이다. 이들 3종의 병원체 그리고 질병에 대한 통합 방제시스템을 구축하기 위하여,

- 1) 주요 감염 경로에 대한 연구,
- 2) 유효한 치료제의 발굴,
- 3) 각 병원체를 정량적으로 검출할 수 있는 검출방법,
- 4) 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 검색시스템 개발,
- 5) 차후 바이러스 질병 연구에 큰 도구가 될 꿀벌유래 세포주의 구축 등을 연구,
- 6) 농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼도 개발하고자 하였다.

본 과제는 곤충학, 생물학, 수의학의 제 분야에서 연구자들이 합심하여 꿀벌질병에 대한 미약한 연구기반을 보다 높이는데 큰 의의가 있었으며, 본 연구의 주요 결과로써;

1) 주요 감염 경로에 대한 연구 분야에서, 지목되어왔던 꿀벌응애의 바이러스성 질병의 전파에 미치는 영향을 정량적으로 확실히 규명하게 되었고, 새로이 부채명나방 등 꿀벌 해충에 의한 병원체의 전파능력까지 규명할 수 있었다.

2) 유효한 치료제의 발굴 분야에서는; 우선 kSBV에 대하여 직접적인 치료효과를 입증한 siRNA에 기반한 치료제를 개발할 수 있었고, *Paenibacillus larvae* (미국부저병), *Melissococcus plutonius* (유럽부저병)의 세균성 병원체와 *Ascosphaera apis* (백목병), *Aspergillus flavus* (석고병)의 진균성 병원체에 대하여 방선균 유래 신물질들을 다수 발굴할 수 있었다.

3) 각 병원체를 정량적으로 검출할 수 있는 검출방법의 개발 분야에서는, 주요 질병의 원인체인 kSBV, *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis* 각각에 대한 병원체를 정량적으로 검출해 낼 수 있는 핵산 기반 신속 진단법들을 개발(정밀 유전자 진단법; 실험실용)하였을 뿐 아니라, 양봉 현장에서 양봉인이 직접 시험할 수 있는 면역클로마토그래피법을 기반으로 한 래피드 키트를 개발하여, 양자 모두 시제품을 넘어 제품화의 단계에 도달하게 하였다.

4) 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 검색시스템 개발 분야에서는, 꿀벌 유충을 기내배양할 수 있는 방법 뿐 아니라, 소비에서 수천의 동시 생장 중인 유충들을 사용하여, 대용량의 동시 또는 차등 감염의 방법을 고안하였고, 약제후보에 대한 기본 독성 검사에 이용할 수 있게 하였다. 이 대용량 검색시스템은 다수의 약제 후보물질에 대한 동시적 평가를 가능하게 하였다.

5) 꿀벌유래 세포주의 구축의 분야는; 꿀벌의 유충, 여왕봉의 유충 등을 이용하고, 다양한 세포배양용 배지를 사용하여 세포주 구축을 추구하였다. 초대배양의 세포들은 다수의 암화

(transformation)관련 유전자들을 도입하여, 세포주의 발굴에 노력하였으나, 결국 안정전 세포주의 획득에는 미치지 못하였다. 그러나 안정적 초대배양세포들을 얻는데는 성공하여, 이 정도의 전진도 현시점에서 크게 활용될 것으로 기대한다.

6) 농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼의 제정 분야에서는; 우선, 본 연구의 성과로써 개발된 현장용 각 병원체에 대한 진단키트의 활용이 각 주요질병의 진단에 우선 적용되는 것으로 하였다. 이는 종전 꿀벌질병에 대한 국가제어가 크게 달라질 것을 제안하는 것으로, 모든 질병 발생의 인식(양봉인)은 우선 현장용 키트를 사용하게 하고, 이 키트의 결과를 보고함으로써, 과학적이며 객관적 진단으로 나아가고자 한다. 이후 제어의 방법은 현시점에서 가장 합리적인 것으로 선별하여 수록하였다.

이로써 본 과제에의 목표는 분야에 따라 초과 달성한 부분도, 약간 미흡한 부분도 있으나 전체적으로 목표를 넘어선 것으로 자평하며, 아울러 국내 양봉질병연구자들의 수준을 크게 향상시켰다고 자위한다. 본 과제에 대한 정량적 연구기반지표 및 사업화지표는 아래의 표와 같다.

2. 정량적 목표의 달성도

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용 홍보		기타 (유전자원등록, 타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	9	6	6	4	0	0	0	0	0	13	11	0	8	0	2	8	11
연구기간 내 달성실적	15	2	6	4	0	0	0	0	0	17	28	79	8	23	2	8	18
달성율 (%)	167	33	100	100	-	-	-	-	-	131	255	100	100	100	100	100	164

가. 특허출원: 총 15 건

- 출원번호: 제 10-2013-0134613, 출원일자: 2013. 11.07, 초고속 PCR 시스템을 이용한 변형 날개 바이러스의 신속 진단 방법, 윤병수, 임희영.
- 출원번호: 제 10-2015-0152030. 출원일자: 2015.10.30. 고리-매개 등온증폭법을 이용한 석고병 신속 검출 방법. 윤병수, 이주성, 용소정, 왕지희, 민상현.
- 출원번호: 제 10-2015-0165168. 출원일자: 2015.11.25. 고리-매개 등온증폭법을 이용한 노제마병 신속 검출 방법. 윤병수, 용소정, 이주성, 민상현, 왕지희
- 출원번호: 제 10-2015-0165175. 출원일자: 2015.11.25. 노제마 아피스 검출을 위한 프라이머

세트. 윤병수, 용소정, 이주성, 민상현, 왕지희

- 출원번호: 제 10-2015-0165179. 출원일자: 2015.11.25. 초고속 PCR을 이용한 낭충봉아부패병의 신속 진단 방법. 윤병수, 민상현, 이주성, 용소정, 왕지희.
- 출원번호: 10-2014-0192347. 출원일자: 2014.12.29. 꿀벌 세포의 일차배양 방법. 주현희, 길성호.
- 출원번호: 10-2013-0103780. 출원일자: 2013.08.30. 금강모치의 Hsp70을 암호화하는 신규 유전자 및 이를 분자지표로 사용하는 방법. 임지수, 공동수, 길성호.
- 출원번호: 10-2013-0134609. 출원일자: 2013. 고리-매개 등은 증폭법을 이용한 진균성 질병 검출 방법. 경기대학교 산학협력단
- 출원번호: 10-2014-0068466. 출원일자: 2014. 온습도센서 고정부를 구비한 꿀벌통. 제주대학교 산학협력단 외 1명
- 출원번호: 10-2014-0068465. 출원일자: 2014. 온습도센서 고정부를 구비한 꿀벌통의 모니터링 장치 및 그 방법. 제주대학교 산학협력단 외 1명
- 출원번호: 10-2014-0042956. 출원일자: 2014. 바나듐 함유 미네랄 조성물과 봉독을 이용한 항산화, 피부미백 및 콜라겐 생성 촉진용 조성물. 제주대학교 산학협력단
- 출원번호: 10-2015-0111525. 출원일자: 2015. 소문개폐부를 구비한 꿀벌통. 제주대학교 산학협력단 외 2명
- 출원번호: 10-2015-0111526. 출원일자: 2015. 무게측정부를 구비한 꿀벌통의 모니터링 장치 및 그 방법. 제주대학교 산학협력단 외 2명.
- 출원번호: 10-2015-0078582. 출원일자 2015. 06.03. 조직내 교잡법을 이용한 낭충봉아 부패병 바이러스 진단용 조성물 및 이를 이용한 진단방법. 채찬희, 박창훈 정지운.
- 출원번호: 10-2012-0151034. 출원일자:2012. 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 감염 진단용 조성물 및 이를 이용한 진단방법. 농림축산검역본부

나. 특허등록: 총 2 건

- 특허번호: 제 10-1552159호. 출원번호: 제 10-2015-0032911, 출원일자: 2015.03.10., 고리-매개 등은 증폭법을 이용한 진균성 질병 검출 방법. 윤병수, 임희영.
- 출원번호: 10-1324875. 출원일자: 2013.10.28. 내인성카나비노이드 분해효소 활성분석을 위한 신규 기질 및 이를 이용한 내인성카나비노이드 분해효소 활성억제제의 검색 및 선별 방법. 김대웅, 길성호.

다. 기술이전: 총 6 건

- 1) *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. flagella antigen 제조법: (주)바이오노트
- 2) *Melissococcus plutonius* antigen 제조법: (주)바이오노트
- 3) SBV VP1의 재조합 단백질 항원 제조법 (pET32a-SBV-VP1): (주)바이오노트

- 4) kSBV VP2의 재조합 단백질 항원 제조법 (pQE30-kSBV-VP2): (주)바이오노트
- 5) DWV VP1의 재조합 단백질 항원 제조법 (pMAL-DWV-VP1-VP3):(주)바이오노트
- 6) BQCV RdRP의 재조합 단백질 항원 제조법 (pMAL-BQCV-RdRP):(주)바이오노트

라. 제품화: 총 4 건

- 1) 미국부저병 신속진단키트 (면역크로마토그래피법): 항원 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* 의 flagella antigen, 제조사: (주)바이오노트
- 2) 유럽부저병 신속진단키트 (면역크로마토그래피법): 항원 *Melissococcus plutonius* antigen 제조사, (주)바이오노트
- 3) kSBV병 신속진단키트 (면역크로마토그래피법): 항원 SBV VP1의 재조합 단백질, 제조사, (주)바이오노트
- 4) DWV병 신속진단키트 (면역크로마토그래피법): 항원 DWV VP1의 재조합 단백질, 제조사, (주)바이오노트

마. 논문- SCI급 학술지: 총 17 건

1. Park C, Kang HS, Jeong J, Kang I, Choi Kim M-S, Kim Y-H, Kang S-W, Yoon B-S, Chae C: In situ hybridization for the detection of sacbrodd virus in infected larvae of the honey bee (*Apis serana*). Journal of Comparative Pathology (in print).
2. Choi K, Lee J, Park C, Jeong J, Chae C: Comparison of the pathogenesis of single or dual infection with type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Journal of Comparative Pathology 152:317-324, 2015
3. Kim T, Park C, Choi K, Jeong J, Kang I, Park S-J, Chae C: Comparison of two commercial type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live vaccines against heterologous type 1 and type 2 PRRSV challenge in growing pigs. Clinical Vaccine and Immunology 22:631-640, 2015
4. Park C, Choi K, Jeong J, Kang I, Park S-J, Chae C: Concurrent vaccination of pigs with type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protects

against type 1 PRRSV but not against type 2 PRRSV on dually challenged pigs. *Research in Veterinary Science* 103:193-200, 2015

5. Do TD, Park C, Choi K, Jeong J, Vo MK, Nguyen TT, Chae C: Comparison of pathogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus between wild and domestic pigs. *Veterinary Research Communications* 39:79-85, 2015

6. Do TD, Park C, Choi K, Jeong J, Nguyen TT, Nguyen DQ, Le TH, Chae C: Comparison of experimental infection with Northern and Southern Vietnamese Strains of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Comparative Pathology* 132:227-237, 2015

7. Rameswor Maharjan and Chuleui Jung. 2015. Insecticide-mediated behavioral avoidance by bean bug, *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae). *Entomological research* 45: 184-192.

8. Nguyen, T.M., V.H.T. Pham and J. Kim. 2015. *Mesorhizobium soli* sp nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek* 108:301-310.

9. Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces gilvifuscus* sp. nov., an actinomycete that produces antibacterial compounds isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:3493-3500.

10. Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces olivicoloratus* sp. nov., an antibiotic-producing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:3262-3270.

11. Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces fabae* sp. nov., a producer of antibiotics against microbial pathogens, isolated from soybean (*Glycine max*) rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:4151-4156.

12. Im J, Kwon G, Kong D, Ghil S.: Identification of a warm-temperature acclimation-associated 65-kDa protein encoded by a temperature- and infection-responsive gene in the Kungang fat minnow *Rhynchocypris kungangensis*.; *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2015 Nov 27. doi: 10.1002/jez.1997.

13. Ju H, Ghil S.; Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*.; *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*; 2015 Oct; 51(9):890-3. doi: 10.1007/s11626-015-9924-9. Epub 2015 Jul 3.

14. Kweon CH1, Nguyen LT2, Yoo MS3, Kang SW. 2015. Differential recognition of the ORF2 region in a complete genome sequence of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from boar bone marrow in Korea. *Gene*. 15;569(2):308-12.
15. Kondreddy Eswar Reddy, 유미선, 김영하, 김남희, Mummadireddy Ramya, 정하나, Le Thi Bich Thao, 이희수, 강승원. 2016. Homology differences between complete Sacbrood virus genomes infected *Apis mellifera* and *Apis cerana* honeybees in Korea. *Virus Genes*. (in print).
16. Reddy KE, Noh JH, Choe SE, Kweon CH, Yoo MS, Doan HT, Ramya M, Yoon BS, Nguyen LT, Nguyen TT, Quyen DV, Jung SC, Chang KY, Kang SW. 2013. Analysis of the complete genome sequence and capsid region of black queen cell viruses from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virus Genes*. 47(1):126-32.
17. Yoo, M. S., Noh, J. H., Yoon, B. S., Reddy, K. E., Kweon, C. H., Jung, S. C., et al. 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *Journal of Virological Methods*. 186(2):147 - 151.
18. Ji M, Cho B, Cho YS, Park SY, Cho SN, Jeon BY, Yoon BS. 2014. Devopment of a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting the MPT64 antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Yonsei Med J*. 55(3):746-52.

마. 논문- 비SCI급 학술지: 총 28 건

- (1) HY Lim, JG Lee, SB Lee, OM Lee and BS 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
- (2) Hee-Young Lim. 2013. Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra-Fast High-Performance PCR (UF-HP PCR). *Korean J. Apiculture* 28(4):237-244
- (3) Joong-Goo Lee, Phu Van Nguyen, Baek Jun Soo, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Detection of capsid protein of sacbrood virus in honeybee using monoclonal antibodies. *Journal of Apiculture* 28(2) : 113~120.
- (4) Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Rapid and sensitive detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid real time pcr. *Journal of Apiculture* 28(2) : 121~129
- (5) Joong-Goo Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. clarification of the korean sacbrood virus based on the analysis of RNA dependent RNA polymerase. *Journal of*

Apiculture 28(4) : 229~236

- (6) Joo-seong Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Development of specific detection method for fungal pathogens in honeybee by loop mediated isothermal amplification. Journal of Apiculture 28(4) : 245~250
- (7) Joo-seong Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Over-expression and Purification of Peptidase-C3G protein of Deformed Wing virus. Journal of Apiculture 29(1) : 57~62
- (8) Hee-Young Lim, So-Jung Yong, Joong-Goo Lee, Mi Jung Ji, Ok-Min Lee and Byoung-Su Yoon. 2014. Development of Specific PCR Method for Detection of Nosema apis Based on Nucleotide Sequence. Journal of Apiculture 29(1) : 27~33
- (9) Joong-Goo Lee, Mi-Jung Ji, Ok-Min Lee, Byoung-Su Yoon and Hee-Young Lim. 2014. Nucleotide Sequence-Based Distinguishment of Sacbrood virus (SBV) using PCR Method. Journal of Apiculture 29(1) : 43~49
- (10) Giang Thi Huong Luong, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Over-expression and Purification of RNA Dependent RNA Polymerase from Black queen cell virus in Honeybee. Journal of Apiculture 29(3) : 173~180
- (11) Joo-Seong Lee, So-Jung Yong, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2015. A Simple and Sensitive Gene-Based Diagnosis of Aspergillus flavus by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Honeybee. Journal of Apiculture 30(1) : 53~59
- (12) Giang Thi Huong Luong and Byoung-Su Yoon. 2015. Over-expression and Purification of Recombinant 3C-like Protease from Black Queen Cell Virus in Escherichia coli. Journal of Apiculture 30(1) : 45~52
- (13) Giang Thi Huong Luong, Joo-Seong Lee, So-Jung Yong and Byoung-Su Yoon. 2015. Development of Ultra-Rapid Reverse Transcription Real-Time PCR for Detection against Black Queen Cell Virus in Honeybee. Journal of Apiculture 30(3) : 171~179
- (14) 임희영, 이순복, 윤병수. 2013. 열화상 사진 자료에 기반한 꿀벌 봉군의 생사 진단 방법에 대한 고찰. Korean J. Apiculture 28(1) : 57~62
- (15) 임희영, 이중구, 윤병수. 2013. RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰. Korean J. Apiculture 28(1) : 63~73
- (16) 이중구, 백준수, 윤병수. 2013. Polyprotein에 기반한 Sacbrood Virus(SBV)와 한국산 SBV의 분류. Korean J. Apiculture 28(5) : 373~378
- (17) 이중구, 이보람, 윤병수. 2012. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발. Korean J. Apiculture 27(4) : 267~274
- (18) 백종희, 이중구, 윤병수. 2012. 꿀벌 유충에 의한 약제 감수성 평가 방법. Korean J. Apiculture 27(4) : 315~319
- (19) Lee, J. and J. Kim. 2014. Control of Chalkbrood by using Actinobacterial Culture. Journal of Apiculture 29(1):21-26.
- (20) Lee, H., T.M. Nguyen and J. Kim. 2015. Isolation of Soil Actinobacterial Strains Showing Antifungal Activity against Aspergillus flavus, a Causative Agent of Stonebrood Disease in Honeybee. Journal of Apiculture 30(1):31-35.

- (21) Nguyen, T.M., H. Lee and J. Kim. 2015. Further Finding of Antimicrobial and Antifungal Activities against Human Pathogens by using the Isolates to Inhibit the Growth of *Paenibacillus larvae*, an Agent of AFB. *Journal of Apiculture* 30(1):37-44.
- (22) Nguyen, T.M. and J. Kim. 2013. Selective isolation of actinobacteria showing antibacterial activity against *Paenibacillus larvae* from soil samples collected in South Korea. *Journal of Apiculture* 28(4):265-272.
- (23) 주현희, 길성호.: 2013: 꿀벌세포의 세포배양에 적합한 성장 배양액 선별, *한국양봉학회지* 28(5), 297~301.
- (24) 강아람·이명렬·이만영·김혜경·윤미영·최용수. 2015. *Bacillus thuringiensis*의 꿀벌부채명나방, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae)에 대한 방제 효과. *J. Apic.* 30(4) : 275~280.
- (25) 김수연식별저자, 김창환, 김지현, 손원근, 황규계, 임윤규. 2013. 미국부저병 원인체 (*Paenibacillus larvae*)의 편모 및 아포에 대한 단일클론항체. *한국양봉학회지*. 28(5):339-344
- (26) Jaehyuk Yang, Janet Han, Kyu-Kye Hwang, Yoon-Kyu Lim. 2015. Incidence of Wolf Teeth in Jeju Ponies and Jeju Pony Crossbreds. *한국임상수의학회지*. 32(3):285-287.
- (27) Sampat Ghosh and Chuleui Jung. 2015. Nutritional evaluation of four commercially available pollen patties in Korea. *Korea Journal of apiculture* 30: 155-160.
- (28) Jung C. 2015. Simulation of varoa mite impact on honeybee health under climate change scenario. *JA* .

바. 학술 발표: 총 79 건

- Joo-Seong Lee, Byoung-Su Yoon. 2013. Comparison of polyproteins RNA dependent RNA polymerase and Peptidase-C3G of deformed wing virus. 세계곤충학회 1주년 기념 공동 심포지엄 및 2013 추계학술발표회. 2013.10. 324
- Joong-Goo Lee, Byoung-Su Yoon. Clarification of the korean sacbrood virus based on nucleotide sequence analysis and a study on the usefulness of RNA dependent RNA polymerase of viral genome. 세계곤충학회 1주년 기념 공동 심포지엄 및 2013 추계학술발표회. 2013.10. 325
- Hee-Young Lim, Byoung-Su Yoon. 2013. Rapid and sensitive detection of deformed wing virus in honeybee by ultra-rapid real time pcr. 세계곤충학회 1주년 기념 공동 심포지엄 및 2013 추계학술발표회. 2013.10. 326
- So-jung Yong, Hee-young Lim, and Byoung-su Yoon. 2014. Simple and Rapid Detection by LAMP to *Nosema apis* in honeybee. The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. COEX, Seoul, Korea. 2014.10.23.
- Joong-Goo Lee, Hee-Young Lim, and Byoung-Su Yoon. 2014. Advanced Molecular Diagnostic System for Typing of Sacbrood Virus by Ultra-Fast On-Site PCR (UF-OS PCR). The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 2014.10.23

- Joo-Seong Lee, Hee-Young Lim, and Byoung-Su Yoon. 2014. Development of Rapid Detection Method for Honeybee Fungal Pathogens by Loop-Mediated Isothermal Amplification. The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 2014.10.23
- Hee Young Lim, Byoung-Su Yoon, and Giang Luong. 2014. Purification of RNA Dependent RNA Polymerase from Black Queen Cell Virus in Honeybee for Generation of Monoclonal Antibody. The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. 2014.10.23
- Joo-Seong Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Application of Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Fungal Pathogens in Honeybee. 12th Asian apicultural association Conference. Antalya, Turkey. 2014.04.24 ~ 2014.04.27
- Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Development and Application of Total Diagnosis System for The Diseases in Honeybee. 12th Asian apicultural association Conference. Antalya, Turkey. 2014.04.24 ~ 2014.04.27
- Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Advanced Rapid Detection of Deformed Wing Virus in Honeybee using Ultra-fast High-performance PCR (UF-HP PCR). 12th Asian apicultural association Conference. Antalya, Turkey. 2014.04.24 ~ 2014.04.27
- Joo Seong Lee, So Jung Yong, Giang Thi huong Luong, Ji Hee Wang, Sang Hyoun Min, Byoung Su Yoon. 2015. Artificial infection of Korean Sacbrood virus to Apis mellifera: Analysis on its capability of viral replication. 44th APIMONDIA International Apicultural Congress. BHO-083. Daejeon, Korea. 2015.09.16
- Sang Hyoun Min, Chil Woo Lee, Sun Bok Lee, Byoung Su Yoon. 2015. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR for detection against Korean Sacbrood Virus. 44th APIMONDIA International Apicultural Congress. BHO-074. Daejeon, Korea. 2015.09.16
- Giang Thi huong Luong, Joo Seong Lee, So Jung Yong, Sang Hyoun Min, Ji Hee Wang, Byoung Su Yoon. 2015. Development of ultra-rapid real-time PCR for detection against black queen cell virus, Korea. 44th APIMONDIA International Apicultural Congress. BHO-021. Daejeon, Korea. 2015.09.16
- So Jung Yong, Joo Seong Lee, Giang Thi huong Luong, Ji Hee Wang, Sang Hyoun Min, Byoung Su Yoon. 2015. Development of molecular diagnostics of honeybee fungal, Korea. 44th APIMONDIA International Apicultural Congress. BHO-072. Daejeon, Korea. 2015.09.17.
- Ji Hee Wang, Joo Seong Lee, Giang Thi huong Luong, So Jung Yong, Sang Hyoun Min, Byoung Su Yoon. 2015. Development of ultra-fast detection method for honeybee fungal pathogens in field. 44th APIMONDIA International Apicultural Congress. BHO-073. Daejeon, Korea. 2015.09.17.
- 이종구, 윤병수. 2013. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP)을 이용한 꿀벌 질병 검출법의 현황. 2013년 제28차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회. 대전광역시 유성구. 2013.02.14.

- 용소정, 임희영, 윤병수. 2014. Development of PCR Detection Method to specific Nosema apis in Honeybee. 2014년 제 29차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회. 수안보 한화 리조트. 2014.04.10.
- 이중구, 임희영, 윤병수. 2014. Development of PCR method for distinguishment of Sacbrood virus (SBV) based on SBV nucleotide acid sequence. 2014년 제 29차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회. 수안보 한화 리조트. 2014.04.10.
- 이주성, 임희영, 윤병수. 2014. Expression of RNA dependent RNA polymorase(RdRp) protein from Deformed Wing virus. 2014년 제 29차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회. 수안보 한화 리조트. 2014.04.10.
- 이주성, 임희영, 윤병수. 2014. Over-expression and Purification of Peptidase-C3G protein of Deformed Wing virus in E.coli system. 2014년 제 29차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회. 수안보 한화 리조트. 2014.04.10.
- 루홍티홍장, 임희영, 윤병수. 2014. Over-expression and purification of RNA dependent RNA polymerase from Black queen cell virus in honey bee. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.26
- 이중구, 임희영, 윤병수. 2014. Development of Rapid Detection Method for Nucleotide Sequence-Based Distinguishment of Sacbrood Virus (SBV) using Ultra-Fast High-performance PCR. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.26
- 이주성, 임희영, 윤병수. 2014. Detection of Aspergillus flavus causing Stonebrood disease using by Real Time PCR. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.25
- 용소정, 이용, 임희영, 윤병수. 2014. Development of Method for the Detection of Nosema apis by Loop-Mediated Isothermal Amplification. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.25.
- 민상현, 임희영, 윤병수. 2014. Expression of peptidase-c3 of Korean Sacbrood Virus in E.coli system. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.25.
- Yong Rhee, ByungSu Yoon and Yoon-kyu Lim. 2014. A tool for precision apiculture: remote sensing system for monitoring the honeybee-controlled microenvironment in the hive. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 농촌진흥청 국립농업과학원. 2014.09.25.
- 누엔만투안, 김재수. 2013. 한국토양시료에서 *Paenibacillus larvae*에 항균활성을 보이는 방선균과 다른 세균의 선택적 분리. KMB's 40th Anniversary, 2013 International Symposium & Annual Meeting, Alpensia, Pyeongchang, Korea, 2013.07.03 ~ 2013.07.05. p. 325.
- 이호재, 김재수. 2013. 방선균을 이용한 미국부저병, 석고병, 백목병 치료를 위한 항생제 개발. KMB's 40th Anniversary, 2013 International Symposium & Annual Meeting, Alpensia, Pyeongchang, Korea, 2013.07.03 ~ 2013.07.05. p. 330.
- 누엔만투안, 김재수. 2013. 변형된 배양기술을 이용하여 한국의 경기대 캠퍼스에서 채집한

- 토양에서 분리한 신종 *Mesorhizobium suwonensis*. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, The-K Seoul Hotel, Seoul, Korea, 2013.10.17 ~ 2013.10.18., p. 195.
- 누엔만투안, 김재수. 2014. 여러 배양방법을 사용하여 다양한 토양시료에서 많은 병원균 억제 항생균주의 발견. American Society for Microbiology 114th General Meeting, Boston, Massachusetts, USA, 2014.05.17 ~ 2014.05.20., p. 117.
 - 누엔만투안, 김재수. 2014. 경기대 캠퍼스에서 채취한 토양에서 신배양기술을 이용해 분리한 *Mesorhizobium tuanensis*. 2014 International Symposium & Annual Meeting, Bexco, Busan, Korea, 2014.06.25 ~ 2014.06.27., p. 359.
 - 이호재, 김재수. 2014. 방선균을 이용한 벌의 백목병 치유를 위한 항진균제 개발. 제29차 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회, 충주 수안보 한화리조트, 2014.04.10 ~ 2014.04.11., p. 40.
 - 이호재, 김재수. 2014. 방선균 배양액을 이용한 석고병의 제어. 잠사.양봉 산업의 미래와 발전전략, 전주시 농촌진흥청 국립농업과학원, 2014.09.25 ~ 2014.09.26., p. 67.
 - 누엔만투안, 김재수. 2014. 산림토양에서 분리한 항생 및 항진균 생산자인 신종 *Streptomyces kyonggiensis*. International Meeting of The Federation of Korean Microbiological Societies, Kintex, Korea, 2014.10.30 ~ 2014.10.31., p. 267.
 - 누엔만투안, 김재수. 2014. 토양에서 분리한 항생물질 생성 신종 *Streptomyces soli*. 잠사. 양봉 산업의 미래와 발전전략, 전주시 농촌진흥청 국립농업과학원, 2014.09.25 ~ 2014.09.26., p. 81.
 - 누엔만투안, 김재수. 2015. Description of *Streptomyces faba* sp. nov., Antibiotic Production Against Microbial Pathogens, Isolated from Soybean (*Glycine max*) Rhizosphere soil. KMB 2015 42nd Annual Meeting & International Symposium, Hico, Gyeongju, Korea, 2015.06.24 ~ 2015.06.26., p. 368.
 - 이승우, 김재수. 2015. Control of European foulbrood by Using Actinobacterial Strains Isolated from Soil. KMB 2015 42nd Annual Meeting & International Symposium, Hico, Gyeongju, Korea, 2015.06.24 ~ 2015.06.26., p. 555.
 - 김재수, 누엔만투안. 2015. Development of new antibiotics from actinomycetes to control bee and human pathogens. 44th Apimondia International Apicultural Congress, Daejeon, Korea, 2015.09.15 ~ 2015.09.19., p. 182.
 - 누엔만투안, 김재수. 2015. Finding new antibiotics through actinobacteria and other bacteria isolated from soil samples. 44th Apimondia International Apicultural Congress, Daejeon, Korea, 2015.09.15 ~ 2015.09.19., p. 405.
 - 누엔만투안, 김재수. 2015. *Variovoraxsoli* sp. nov., Isolated from Forestry Soil Using Modified Uncultured Method. 2015 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, Kintex, Korea, 2015.11.05 ~ 2015.11.06., p. 356.
 - 주현희, 길성호; Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*; 대전세계양봉대회; 대전 DCC 컨벤션센터; BBP-034(발표번호); 2015.09.15 ~ 2015.09.19.
 - 주현희, 길성호; Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*; 한국양봉학회 춘계학술대회; 대전 DCC 컨벤션센터; BH-21(발표번호); 2015.0316-17

- 주현희, 길성호; Selection of Compatible Growth Media for Cell Culture of Honey Bee Cells; 한국양봉학회 특별강연 및 학술발표회; 수안보 한화리조트; 2014.04.10.-11
- Tran Van Toan, Myeong Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, and Yong Soo Choi. 2014 Methods for studying on morphological characteristic of Asian honey bee (*Apis cerana*). 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Tran Van Toan, Myeong Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, and Yong Soo Choi. 2014. Rearing the Honey bee (*Apis cerana*) In-vitro. 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Tran Van Toan, Myeong Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, and Yong Soo Choi. 2014. Measurement for Biological Controlling of Sacbrood virus on Honey Bee (*Apis cerana*). 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Yong Soo Choi*, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, Tran van Toan, Myeong Lyeol Lee. 2014. Honeybee (*Apis cerana*) collapse in Korea by Sacbrood virus. 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Yong-Soo Choi, Myeong- Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, Mi young Yoon, Ah Rang Kang, Toan Van Tran. 2014. Analysis of Morphology and Determination of Interference competition between two honeybee mites: *Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae* (Acari: Varroidae and Laelapidae). 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Yong Soo Choi, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, Tran van Toan and Myeong Lyeol Lee. 2014. Gene Regulation of *Apis mellifera* Feb. by Infestation of Honeybee mites (*Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae*). 2014 한국응용곤충학회 추계학술발표회. 2014. 10. 16.~17. 문경
- Ah Rang Kang, Mi young Yoon, Myeong- Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, Than Van Tran, Yong-Soo Choi. 2014. Characterization and Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. (B.t K1) against Wax Moths(*Galleria mellonella* and *Achrobia gricella*) in Korea. 제29차 한국양봉학회 추계학술대회. 2014. 9.25.~26. 전주
- Gyu Ho Byuon, Myeong- Lyeol Lee, Than Van Tran, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Yong-Soo Choi. 2014. Nosema disease on honeybee *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Korea. 제29차 한국양봉학회 추계학술대회. 2014. 9.25.~26. 전주
- Yong-Soo Choi, Myeong- Lyeol Lee, Ha Sik Sim, Hye Kyung Kim, Gyu Ho Byuon, Mi young Yoon, Ah Rang Kang, Toan Van Tran. 2014. Determination of Interference competition between two honeybee mites: *Varroa destructor* and *Tropilaelaps clareae* (Acari: Varroidae and Laelapidae). 제29차 한국양봉학회 추계학술대회. 2014. 9.25.~26. 전주
- Yong Soo Choi, Myeong Lyeol Lee, Man Young Lee, Hye Kyung Kim and Kyu ho Byeon. 2015. In vitro method for Rearing larvae: *Apis cerana* L. 제58차 추계한국잡사학회. 2015. 10. 22.~23. 광주광역시.
- Nguyen Ngoc Vung. Myeong-Lyeol Lee, Man-Young Lee, Yong-Soo Choi. 2015. Introduce about Vietnamese Beekeeping. 제58차 추계한국잡사학회. 2015. 10. 22.~23. 광주광역시.

- Yong Soo Choi, Myeong Lyeol Lee, Man Young Lee, Hye Kyung Kim and Kyu ho Byeon. 2015. Rearing *Apis cerana* larvae by In vitro method. Apimondia. 2015. 9. 15.~20. 대전
- Claire Villemant, Quentin Rome, Moon Bo Choi, Yong Soo Choi, 2015. An identification information sheet for of the invasive hornet *Vespa velutina* (Hymenoptera, Vespidae) and possible areas of confusion with other wasp species. Apimondia. 2015. 9. 15.~20. 대전
- Yong Ree. 2014. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 2014.09.25. 국립농업과학원. 한국
- Youngseok Jung. 2014. 2014년 제 29차 한국양봉학회 추계학술발표회. 2014.09.25. 국립농업과학원. 한국
- Dan Yoon. 2014. 2014 KSPVM Symposium. 2014.09.25. 충북대학교 개신문화관. 한국
- Jong Moon Cho. 2014. 2014 KSPVM Symposium. 2014.09.25. 충북대학교 개신문화관. 한국
- Kyong-Leek Jeon. 2014. 2014 KSPVM Symposium. 2014.09.25.. 충북대학교 개신문화관. 한국
- Jihyun Kim. 2015. 2015 한국실험동물학회 동계Symposium. 2015.02.26.. 용평리조트. 한국
- Youngseok Jung. 2015. 2015 한국실험동물학회 동계Symposium. 2015.02.26.. 용평리조트. 한국
- Dan Yoon. 2015. 2015 한국실험동물학회 동계Symposium. 2015.02.26.. 용평리조트. 한국
- JongMoon Cho. 2015. 2015 한국실험동물학회 동계Symposium. 2015.02.26.. 용평리조트. 한국
- Mingu Kim. 2015. 2015 한국실험동물학회 동계Symposium. 2015.02.26.. 용평리조트. 한국
- Yoon-kyu Lim.2015. 2015 한국양봉학회 춘계 Symposium. 2015.03.17.. 대전DCC. 한국
- Yoon-kyu Lim.2015. 2015 세계양봉대회. 2015.09.17. 대전DCC. 한국
- JongMoon Cho. 2015. 2015 세계양봉대회. 2015.09.17. 대전DCC. 한국
- 정하나의 5명. Propagation of Sacbrood viruses on honeybee larvae by artificial infection. 2015. 한국양봉학회 춘계학술대회. 2015-03-17. 대전 DCC
- 유미선 외 6명. 2015. Complete SBV genome isolation and comparison from *A. cerana* and *A. mellifera* in Vietnam. 한국양봉학회 춘계학술대회. 2015-03-17. 대전 DCC
- 유미선의 5명. 2015. Molecular Detection of Honeybee Disease in *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Korean apiaries, 2014. 한국양봉학회 춘계학술대회. 2015-03-17. 대전 DCC
- 유미선의 5명. 2015. Control of Korean Sacbrood Virus Infection by dsRNA. 한국양봉학회 춘계학술대회. 2015-03-17. 대전 DCC
- 유미선의 4인. 2015. Prevention of Korean Sacbrood Virus Infection in *Apis cerana* using dsRNA. 대한수의학회 춘계학술대회. 2015-04-29. 서울대학교 삼성컨벤션센터.

- 유미선 외 6명. 2015. Molecular detection of honeybee disease in *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Korean apiaries, the first half 2015. 제44회 2015 세계양봉대회. 2015-09-17. 대전컨벤션센터 및 대전무역전시관 일원
- 유미선의 6명. 2015. Control of Korean Sacbrood Virus using RNA Interference in *Apis cerana*. 제44회 2015 세계양봉대회. 2015-09-17. 대전컨벤션센터 및 대전무역전시관 일원
- 정하나의 6인. 2015. Artificial infection of Honeybee larvae with Sacbrood virus for propagation. 제44회 2015 세계양봉대회. 2015-09-17. 대전컨벤션센터 및 대전무역전시관.
- 유미선의 7명. 2015. Homology between complete Korean Sacbrood virus genomes in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. 제44회 2015 세계양봉대회. 2015-09-17. 대전컨벤션센터 및 대전무역전시관.
- 유미선의 7인. 2015. Complete SBV genome isolation and comparison from *A. cerana* and *A. mellifera* in Vietnam. 제44회 2015 세계양봉대회. 2015-09-17. 대전컨벤션센터 및 대전무역전시관.

사. 교육지도: 총 8 건

번호	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	꿀벌질병진단	꿀벌질병진단	꿀벌질병 진단방법 소개	2013
2	The development of surveillance system based on Ubiquitous Information Technologies in Apiculture	201304 강의록	양봉의 USN 응용	2013
3	양봉공부	201310 강의록	일간온습도변화	2013
4	정기세미나	201311 강의록	발벌의 음향분석	2013
5	2014 양봉인 대회	2014 양봉인 대회	IT 융복합기술에 의한 양봉관리 system	2014
6	곤충산업발전방안 간담회	산업곤충간담회 2015	산업곤충의 질병관리 방안 제시	2015
7	세계양봉대회, 대전	Presentation, 키트사용 Workshop	꿀벌의 질병에 대한 유전자 진단 키트 워크샵	2015
8	세계양봉대회, 대전	Presentations, 키트사용 Workshop	꿀벌의 질병에 대한 면역키트 워크샵	2015

아. 인력양성: 총 23 건

번호	분류	기준년도	인력양성 현황										
			학위별				성별		지역별				
1	수의학, 농학, 생명과학	2013	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				3	6		7	2	6				3
1	수의학, 농학, 생명과학	2014	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				3	3		4	2	4				2
2	수의학, 농학, 생명과학	2015	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				5	3		4	4	5				3

자. 정책활용: 총 2 건

번호	정책활용상태	주관부처	시책추진실적 및 계획	활용년도
1	(사)곤충산업연구소 설립	농축산부	양봉산업을 포함한 곤충산업 연구 및 대농민 봉사	2014~
2	꿀벌 병원체 유전자 진단방법 도입	농림축산검역본부	15종의 꿀벌 병원체에 대한 실시간 PCR법 (정밀 유전자 진단법) 도입 및 적용, 개선	2014~

차. 홍보/전시: 총 8 건

(1) 언론 기고

번호	홍보유형	매체명	홍보내용	홍보일자
1	언론기고	제주일보	양봉육성을 위한 정책수립이 필요함(IPET의 지원으로 연구진행중임을 언급)	2013. 07. 24.

(2) 전시회 등 참여

번호	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	전시회	2014양봉인대회	사육환경 모니터링 시스템	제주도 서귀포	2014.11.
2	박람회	2015 세계양봉대회	꿀벌의 질병에 대한 유전자 진단 키트 워크샵	대전	2015.09.
3	박람회	2015 세계양봉대회	사육환경 모니터링 시스템	대전	2015.09.
4	박람회	2015 세계양봉대회	꿀벌의 질병에 대한 면역 진단 키트 워크샵	대전	2015.09.

(3) 기타 활용 및 홍보실적

번호	일자	활용명칭	활용내역
1	2015.09.17.	APIMONDIA 2015 강연	연구결과, 개발내용 발표
2	2015.09.18.	APIMONDIA 2015 강연	연구결과, 개발내용 발표
3	2015.09.19.	APIMONDIA 2015 강연	연구결과, 개발내용 발표

카. 기타: 유전자원 등록 (GenBank에 등록 18건)

1. Lee,J.-S., Yoon,B.-S. and Lim,H.-Y. GenBank: 732566.1. Deformed wing virus strain js1 peptidase-c3g gene, partial CDs. 2015.05.04.
2. Lee,J.-S., Yoon,B.-S. and Lim,H.-Y. GenBank: KP751410.1. Deformed wing virus strain js1 polyprotein gene, partial CDs. 2015.05.04.
3. Lee,J.-S., Yoon,B.-S. and Lim,H.-Y. GenBank: KP739938.1. Deformed wing virus strain js1 capsid protein VP1 gene, partial CDs. 2015.05.04.
4. Lee,J.-S., Yoon,B.-S. and Lim,H.-Y. GenBank: KP739937.1. Deformed wing virus strain js1 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial CDs. 2015.05.04.
5. Luong,G.T. and Yoon,B.S. GenBank: KR074231.1. Black queen cell virus strain LI1 structural polyprotein gene, partial CDs. 2015.05.20.
6. Luong,G.T. and Yoon,B.S. GenBank: KR074232.1. Black queen cell virus strain MI1 structural polyprotein gene, partial CDs. 2015.05.20.

7. Luong,G.T.H., Yoon,B.S. and Lim,H.Y. GenBank: KP307016.1. Black queen cell virus strain GI2 protease 3C gene, partial CDs. 2015.03.09.
8. Luong,G.T.H., Yoon,B.S. and Lim,H.Y. GenBank: KP271981.1. Black queen cell virus strain GI1 RNA-dependent RNA polymerase gene, partial CDs. 2015.03.09.
9. Nguyen,T.M. and Kim,J. GenBank: KJ995984.1. *Bacillus* sp. T515 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2015.02.19.
10. Nguyen,T.M., Pham,V.H. and Kim,J. GenBank; KC484966.1. *Mesorhizobium* sp. NHI-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2015.07.28.
11. Nguyen,T.M., Pham,V.H. and Kim,J. GenBank: KM188061.1. *Mesorhizobium* sp. NHI-8 recombination protein A (recA) gene, partial CDs. 2015.07.28.
12. Nguyen,T.M., Pham,V.H. and Kim,J. GenBank: KM188059.1. *Mesorhizobium* sp. NHI-8 ATP synthase beta subunit (atpD) gene, partial CDs. 2015.07.28.
13. Nguyen,T.M., Pham,V.H. and Kim,J. GenBank: KM188060.1. *Mesorhizobium* sp. NHI-8 glutamine synthetase II (glnII) gene, partial CDs. 2015.07.28.
14. Tuan,N.M. and Kim,J. GenBank: KM229363.1. *Streptomyces* sp. T258 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2014.10.06.
15. Tuan,N.M. and Kim,J. GenBank: KM229362.1. *Streptomyces* sp. T113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2014.10.06.
16. Tuan,N.M. and Kim,J. GenBank: KM229359.1. *Streptomyces* sp. T13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2014.10.06.
17. Tuan,N.M. and Kim,J. GenBank: KM229361.1. *Streptomyces* sp. T110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2014.10.15.
18. Tuan,N.M. and Kim,J. GenBank: KM229360.1. *Streptomyces* sp. T66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. 2014.10.06.

* 2015년 9월 대전 컨벤션센터에서 열린 44회 세계양봉대회 (APIMONDIA)는 국내외 1만명이 참가한 대규모 행사임. 이 학술대회에 본 과제의 연구원들을 포함한 전 양봉관련 학자들이 주최측의 입장에서 대거 참여하였고, 국내 양봉학의 위상을 크게 홍보하였음.



• 2015 APIMONDIA (세계양봉대회) 전시.

3. 관련분야의 기술발전에의 기여도

본 과제 연구 성과의 가장 큰 기여 분야는 바로 양봉 현장이라 할 것이다. 양봉인들에 대한 주요 감염성 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼은 바로 양봉 현장에서 질병의 예방과 진단과 제어의 교과서가 되어야 할 것이며, 본 과제에서 개발된 현장용 진단키트들은 양봉인과 국가 기관간의 협력을 통하여 효과적인 질병 제어를 가능하게 할 것이며, 이런 양봉인이 스스로 하는 과학적 질병진단을 적극 추진하여야 할 것이다.

한편, 양봉질병관련 국가기관 및 연구기관들은 본 과제에서 개발된 꿀벌 병원체에 대한 경질 유전자 진단법, 신약 후보물질들을 적극 도입하여 전국의 연구기관과 함께 공조의 이점을 가져야 할 것이다. 이에 양봉인들에게 보급되어야 할 현장용 신속 진단키트들은 국가기관과 함께 그 결과를 공유하여야 할 것이며, 또한 약제의 처치 후, 그 효능을 평가할 수 있도록 키트의 사용과 사용 약제의 효능을 병진할 수 있어야 할 것이다.

또한 본 과제에서 개발된 유충을 이용한 대용량 *in vivo* 시스템은, 신약개발과정에서 그 장점을 쉽게 보일 수 있는 것으로 판단되며, 참여기업 및 관련기업에서 이외 활용에 보다 관심을 기울여야 할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연구성과물들의 개요.

본 연구의 연구개발 목표는 본 연구의 목표는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병(SBV), 부저병, 석고병에 대한 통합 방제 시스템의 개발이다. 이 목표를 달성하기 위하여, 상기 꿀벌 질병의 치료 및 방제를 위한 효과적인 꿀벌약품들을 탐색 및 개발하고, 꿀벌에 무분별하게 사용되어온 약품 등(미등록 약품 포함)에 대한 표준사용법을 개발하고, 유효한 면역증강 물질을 탐색 및 개발하고자 하였다.

연구의 결과로써, 먼저 바이러스 질병의 전파 차단 방법의 제시할 수 있었으며, 3종의 주요 꿀벌에 대하여 9종이상의 유효한 치료제를 제시할 수 있었고, 3종의 병원체를 각기 정량적으로 검출해 낼 수 있는, 핵산 기반 신속 진단법들, 현장용 면역클로마토마토그래피법을 개발할 수 있었다. 이올러 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 시스템과 꿀벌유래 세포주의 개발에서도 우수한 초대 배양의 조건을 확립하는 등 소기의 목적을 달성할 수 있었다.

본 연구는 꿀벌의 주요 감염성 질병인 낭충봉아부패병, 부저병, 및 석고병을 대상으로 하며, 해당 병원체는 각각 바이러스인 SBV, 세균인 *Paenibacillus larvae*, 진균인 *Ascosphaera apis* 이다.

이들 3종의 병원체 그리고 질병에 대한 통합 방제시스템을 구축하기 위하여, 1) 주요 감염 경로에 대한 연구, 2) 유효한 치료제의 발굴, 3) 각 병원체를 정량적으로 검출할 수 있는 검출방법, 4) 대용량 약물후보를 검색할 수 있는 검색시스템 개발, 그리고 5) 차후 바이러스 질병 연구에 큰 도구가 될 꿀벌유래 세포주의 구축 등을 연구 개발하였으며, 농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼도 개발하고자 하였다.

먼저 바이러스 질병의 전파 차단 방법의 방법을 꿀벌용애 등 해충의 방제 방법을 제시할 수 있었으며, kSBV, *Paenibacillus larvae*, *Ascosphaera apis*의 주요 꿀벌질병에 대하여 각기 3종 이상씩의 현 시점에서 유효한 치료제를 제시할 수 있었고, 다수의 신약 후보 물질들을 발굴할 수 있었다.

또한 상기 3종의 병원체를 각기 정량적으로 검출해 낼 수 있는, 핵산 기반 신속 진단법들을 개발하여 질병의 현장에서, 그리고 국가적 질병제어를 위한 검사기관에서 사용할 수 있도록 하였을 뿐아니라, 양봉 현장에서 양봉인이 직접 시험할 수 있는 면역클로마토마토그래피법을 기반으로 한 래피드키트를 개발하여, 양자 모두 시제품을 넘어 제품화의 단계에 도달하게 하였다.

이올러 꿀벌의 유충을 이용하는 대용량 약물후보 검색 시스템을 확립할 수 있었으며, 바이러스 연구에 필수적인 꿀벌유래 세포주의 개발에서도, 우수한 초대 배양의 조건을 확립하는 등 소기의 목적을 달성할 수 있었다.

또한 양봉농가에서 바로 활용할 수 있는 주요 질병에 대한 표준 방제 매뉴얼도 개발하였다.

주요 3개 질병의 병원체에 대한 실험실용 정밀 정량 검사법들(초고속 PCR법)과 양봉 현장용 간이진단법들(면역크로마토그래피법)의 제품화는, 양봉질병에 관한 국가의 질병제어 정책을 변환시킬 수 있는 기반을 만든 것이라 하겠다. 지난 수십년간 약제의 무상분배로 인하여 질병에 대한 저항성만 높아지게 된 것은 지금은 지양해야할 정책이며, 이제 양봉현장에 간이진단키트를 적극적으로 배포하고, 그 결과에 따라 양봉인이 국가기관의 지도하에 치료를 수행하는 “선진단 후치료”의 정책을 시작하여야 할 것이다.

제 2 절. 본 연구에 의하여 발표된 학술논문들 및 성과물들

본 연구의 결과들은 국제 SCI 저널에 17편의 논문으로, 국내의 비SCI 전문학술지에 28편의 논문으로, 또한 국내 전문학회에서 79편의 논문이 각기 출판, 발표되었다. 관련 특허는 총 15건이 출원되었으며, 2건의 특허는 이미 등록을 마쳤다.

이들의 연구결과는 매우 방대하여, 매우 다양한 후속연구 및 관련 연구분야에 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 국내 꿀벌질병의 국가적 제어를 담당하고 있는 농림부의 방역정책의 변화와 본 성과물들의 활용을 기대하고 있다.

주지하는 바와 같이 지난 수십년간 국내의 꿀벌질병제어는 수의사의 부족 등의 이유로 사실상 양봉인에게만 맡기게 되었으며, 국가의 역할은 단지 꿀벌질병 방역비를 책정하고, 양봉인이 원하는 약제(꿀벌응애 제거제, 꿀벌 노제마병 치료제)를 구입하여, 양봉인에게 무상으로 분배해주는 수준이었다. 이 결과, 국내의 양봉 위생은 현재까지 개선되는 바를 찾을 수 없었으며, 양봉에서 사양관리비를 웃도는 개인 방역비(약값)이 지출되어야 하는 수준이 이르게 되었다.

이는 모두 과학적 진단을 양봉인에게 맡기고, 다만 무상 치료제를 공급함으로써, 저항성 해충(프로발리네이트 저항성 꿀벌응애)와 저항성 세균(테트라사이클린 저항성 미국부저병균)의 위험을 야기시킨 것으로, 지금이라도, 과학적 진단 후, 치료약을 국가 관리하에 사용하게 하는 정상적인 방향으로 돌아서야 할 것이다.

본 과제에서 제시하는 주요질병에 대한 현장용 면역 진단키트들은, 타 분야에서 이미 널리 사용되는 것이며, 별도 기기없이 현장에서 10분 수준에 비전문가도 진단이 가능한 방법이다. B형 간염에 대한 면역 진단키트는 이미 개당 가격이 수백원 수준으로 저렴해 졌으며, 양봉 현장에서도 이 키트들을 상용화 할 수 있는 정책이 진행된다면, 국가기관과 양봉인 모두가 보다 합리적인 “선진단 후치료”의 방향으로 돌아설 수 있을 것이다.

이외 본 과제의 성과물들은 각기 꿀벌질병의 극복을 위하여 일익을 담당할 것이며, 향후 보다 구체적인 파급연구가 진행되기를 기대한다.

본 연구에서 출판된 학술논문들은 “제 4 장 목표달성 및 기여도”에 전체 목록을 수록하였으며, 본 장에서는 중복을 피하기 위하여 재수록을 생략한다.

제 3 절. 꿀벌 주요 질병 진단을 위한 Immunochromatography 키트들.

본 연구에서 생산된 재조합 DNA법의 항원들, 그리고 순수 분리한 항원들은 모두 단클론 항체의 제작에 사용되었다. 이 중 주요 병원체에 대한 특이 항체 클론들은 최적의 Capture/Dectector 쌍을 선발하여 immunochromatography법에 의한 Rapid kit로 제작되었고, 이들은 시제품 수준을 넘어서 시판을 위한 최종 검사 단계에 있다.

특이 항체를 사용하는 면역학적 키트(Rapid kit)들은 주요 질병에 대한 것을 우선으로 현재 (주)Bionote와 제품화 실험이 완료단계에 있으며, 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 제품들의 사용설명서(예)와 각 제품의 사진들이다.

꿀벌의 낭충봉아부패병(kSBV) 검출을 위한 면역학적 신속검사법
(Immunochromatographic rapid test: IC-SBV-01)

본 제품은 낭충봉아부패병의 병원체인 kSBV (korean SacBrood Virus)에 대한 면역학적 신속 검출법 키트(Immunochromatographic rapid test)로써, 시료 중 kSBV를 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)

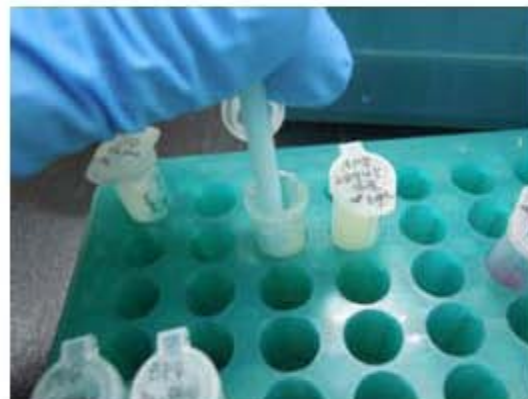
검사의 순서

1. 검사하고자 하는 꿀벌의 에벌레를 용출용 완충액의 튜브에 넣는다.

* 검체의 양은 0.2 ml를 기준으로 합니다. 이는 보통 꿀벌 성충 1마리에 해당되며, 에벌레의 경우 몇 마리들 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 멍어리가 없는 정도까지입니다. 용출액이 튜브밖으로 나오지 않도록 주의합니다.



3. 미니분쇄기를 사용하여, 용출액 수 방울을 본체(cassette)의 시료투입구(S)에 투입한다.

* 미니분쇄기는 플이 큰 원추형으로 되어있어 큰 방울을 일시적으로 옮겨줄 수 있습니다. 분쇄된 용출액에 분쇄기 끝을 잠기게 하였다가 바로 본체 시료투입구위에 분쇄기 끝을 위치시키어 큰 방울

로 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.

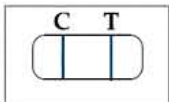
4. 본체(cassette)가 수평이 되게 두고 C선에 붉은 선이 형성되기를 기다린다.

* 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.

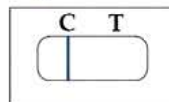
5. 결과의 판독: C선과 T선 모두에 붉은 선이 형성되면 양성으로 판정.

* 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.

Positive



Negative



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 membranew를 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 membranew를 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 1. 낭충병(SBV) 진단용 rapid kit; Sac Brood Virus 검출 immunochromatography (IC-SBV-01)



그림 2. 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)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

2011년부터 시작된 국내 토종벌에 대한 kSBV의 공격은 30만군에 이르던 국내 토종벌의 집단을 2015년 현재 1만여군이 잔류되는 참화를 야기시켰다. 한 종의 바이러스에 의하여 일국 또는 여러 국가의 생물종이 전멸의 위기에 처하게 되는 것은 역사적 사실 만이 아니며, 국내 양봉질병관계자들은 이 참상을 실지 목격하게 되었다.

꿀벌 질병의 극복은, 꿀벌이라는 생물체에 관심을 가진 수의학, 농학, 면역학, 바이러스학, 유전체학, 약리학, 제약학 등 다양한 학문분야의 전문가들에 의한 오랜 연구가 축적되어, 하나씩 진보를 이루고, 하나씩 극복해 나아가야 하는 과제임을 새삼 명심하게 된다.

근래 바이러스질병에서 눈에 띄는 하나의 연구업적은 인간에 대한 HIV 제어 가능성을 보여준 사례이며, 이 정도의 공공의 관심과 노력이 이제 겨우 방향을 잡았음을 보여주고 있다.

꿀벌질병에 대하여는 독일 Wuerzburg대학과 Freiburg대학의 연구팀이 수행한 꿀벌 바이러스에 대한 정량적인 실험들이, 관련 홈페이지에 오픈되어 있으며, 전 세계 전문 연구자의 홈페이지는 근간의 진보를 매우 체계적으로 보여주고 있다 (거의모든 논문이 다운로드 가능).

제 7 장 연구시설·장비 현황

특기할 사항이 없습니다.

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

1. 주관연구기관

가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(1) 실험실 안전 점검 체계



- > 과학기술분야 실험 실습실의 효율적인 안전관리를 위하여 조직화하여 체계적으로 관리
- > 관리위험등급의 지정 (B등급해당)
 - A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물,
방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
 - B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
 - C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

(2) 실험실 안전점검 및 정밀안전진단 실시

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실 [경기대학교 실험 실습실 159실]
- 기관 : (주)누리엔소방·전기·안전
- 실시 : 1년마다 1회 실시하여 교육과학기술부에 보고
- 주요항목 : 일반안전, 소방안전, 전기안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 산업안전, 생물안전

- 주요장비 : 일산화탄소농도측정기의 16종

나. 교육 훈련

(1) 개요 :

실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 실시

교육과정	교육대상	교육시간	교육내용
전기 교육·훈련	연구활동종사자	2시간이상	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실 안전 환경조성법령에 관한 사항 • 실험 · 실습실내 유해 · 위험요인에 관한사항 • 안전한 연구개발활동에 관한 사항 • 물질안전자료에 관한 사항 • 그 밖에 실험실 · 실습실 안전관리에 관한사항
신규채용 등에 따른 교육 · 훈련	신규채용된 연구활동 종사자(계약직 포함)	4시간이상	<ul style="list-style-type: none"> • 연구실 안전 환경조성법령에 관한 사항 • 실험 · 실습실내 유해 · 위험요인에 관한사항 • 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한사항 • 실험 · 실습실 사고사례 및 사고예방 대책에 관한 사항 • 안전표지에 관한 사항 • 물질안전자료에 관한 사항 • 그 밖에 실험실 · 실습실 안전관리에 관한사항
	대학 연구기관등에 채용된 자 외의 자로 서 신규로 연구개발 활동에 참여하는 연 구활동종사자(대학생 · 대학원생, 연구보 조원 등)		
특별안전 교육 · 훈련 (사이버안전교 육)	연구활동종사자	2시간이상	<ul style="list-style-type: none"> • 실험 · 실습실내 유해 · 위험요인에 관한사항 • 안전한 연구개발활동에 관한 사항 • 물질안전자료에 관한 사항 • 그 밖에 실험실 · 실습실 안전관리에 관한사항

다. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부 서
연구실 안전공제보험	상해사망,휴우장애 -> 1억원 부상 ->1천만원	대학(원)생 연구(보조)원	시설관 리팀
학교경영자 배상 책임보험	대인배상 : 2억원(1인당), 10억원(1사고당) 대물배상 : 3천만원(1사고당) 구내외치료비 : 3백만원(1인당/ 1사고당) 상해사망휴우장애 3천만원(1인당) 상해의료비 2백만원(1인당/1사고당)	대학(원)생	학생복 지처
교직원 단체상해보험	재해사망, 후유장해, 일반사망 : 5천만원/인 의료비지원 - 암치료비 : 2천만원/인당 - 뇌혈관, 허혈성질환 진단비 : 1천만원/인당 - 상해의료실비 : 5백만원/인당 - 질병입원의료비 : 3천만원/인당 - 상해외래의료비 : 25만원/인당 - 상해처방조제의료비 : 5만원/인당	교직원	인사팀

라. 추가 이행 계획

1) 연구활동 종사자 건강검진(매년실시)	1. 건강검진 2. 특수건강검진
2) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
3) 실험실 위험성평가	매년 실험실에 위험성을 평가하여 대책수립
4) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설치	위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화 설비를 설 치 하여 사고 확산을 예방
5) 실험실 환경개선공사	노후 실험실, 시설 개선공사 시행
6) 인화물질 보관	보관창고를 설치하여 통합관리
6) 실험실 환경안전지침 작성	보완작성
7) 고압가스 안전관리	안전시설 설치
8) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치
9) 약품누출사고 대비훈련	매년마다 실시

2. 제 2 협동기관

가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(1) 실험실 안전 점검

위험등급	점검주기	분류 기준
A등급	분기 1회	가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물의 취급, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
B등급	반기 1회	일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생 실험실
C등급	연 1회	이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

(2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 실험실안전관리규정에 의거 실험실의 위험정도에 따라 A, B, C로 관리등급을 분류하여, 실험실환경안전점검을 실시하고 있으며, 안전점검실시 결과 실험실의 재해예방과 안전성 확보 등을 위하여 필요하다고 인정되는 경우에는 전문기관에 의뢰하여 정밀 안전진단을 실시함

나. 교육 훈련

(1) 관련근거

연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제 17조 및 동법 시행규칙 제 9조 실험실 안전관리 규정 제 16조(안전교육), 제 17조(안전교육의 관리)

(2) 교육대상

실험실을 출입하는 모든 이용자 (교수, 대학원생, 실험조교, 전문 직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

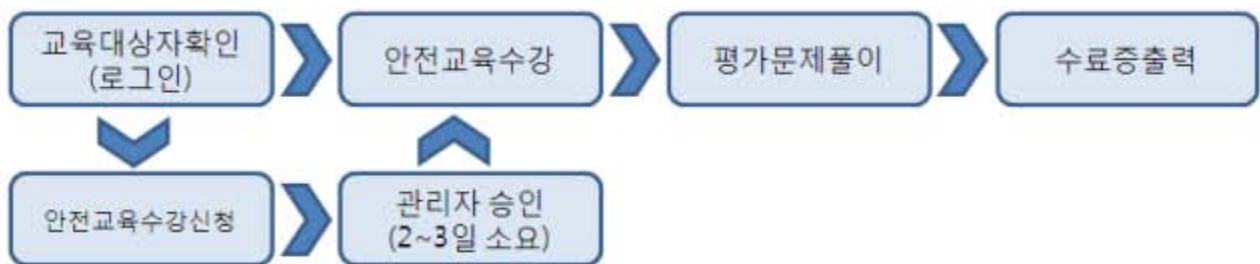
(3) 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A, B, C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, 1년에 8시간 이상 교육이수 필수
- 수료인정기간은 수료증의 수료인정기간 까지(유효기간이 지나면 재교육 이수)

(4) 안전교육 과정

- 전공복성에 따라 A, B, C 코스로 구분하여 교육 실시
- A코스 : 생물·방사선 취급
- B코스 : 화학·가스 취급
- C코스 : 전기·기계 취급

(5) 안전교육절차



다. 안전관리추진계획

- 각 실험 단과대학별 안전관리실무위원회 구성 및 운영
- 교내 전체 건물 소방시설 통합관리체계(FMS) 구성
- 실험실 내부 점검실시 후 실험등급 지정표찰 부착
- 건물별 복도 및 비상계단 통로 확보와 불법 사무실 철거
- 사이버 안전 교육 훈련

* 「연구실 안전환경 조성에 관한 법률」에 따른 연구실 안전조치 이행계획(해당 연구실 안전 점검 및 정밀안전진단실시, 참여연구원의 교육훈련 및 건강검진실시, 보험가입 등) 및 기타 당해 연구개발사업 수행 시 필요한 연구실안전 확보 계획 등을 서술

3. 제 2 협동기관

실험실의 재해 예방과 안전성 확보를 위하여 전반적인 관리 상태를 점검하여 잠재된 위험 요인을 식별하고, 연구실 안전환경 조성에 관한 관련법률에 의거 실험실에 대한 종합적인 안전성을 평가하여 효과적인 개선 대책을 수립, 이를 기반으로 연구실 종사자의 안전사고를 사전에

예방 하고자 다음과 같은 연구실 안전조치 이행을 계획한다.

1. 연구실 안전관리총괄책임자 및 담당자를 임명한다.
2. 안전보건 교육, 건강검진 및 보험가입을 실시한다.
3. 실험실 안전사고 예방 및 사고발생보고하게 하며
4. 안전관리담당자는 실험실 출입문 상단에 실험실 안전수칙을 부착하며, 담당 실험실에 대하여
다음 각 호의 임무를 수행한다.
 - (1) 실험실의 시설물, 기기, 시약 및 기타 위험물 등의 취급, 유지관리, 폐기에 관한 사항
 - (2) 실험실 활동종사자에 대한 안전교육 및 지도에 관한 사항
 - (3) 실험실 운영과 이상 점검에 관한 사항
 - (4) 실험실습중에 발생할 수 있는 사고의 예방조치에 관한 사항
 - (5) 실험실에서 발생하는 각종 폐수, 폐기물의 처리에 관한 사항
 - (6) 연구·실험 등으로 발생한 환경오염 물질을 안전한 유지·관리
5. 실험폐액, 감염성폐기물 등의 수집 및 처리
 - (1) 실험실별 실험폐액 수집 및 처리는 폐기물관리법에 의한다.
 - (2) 실험실에서 수집된 감염성폐기물 수집 및 처리는 감염성폐기물처리법에 따라 처리한다.
6. 시약 및 위험물 등의 관리 및 처리
 - (1) 시약 및 위험물 등은 실험실별로 지정된 장소에 안전하게 격리보관 하여야 하며, 보관 장소는
보관물의 특성에 맞는 시설을 갖추어야 한다.
 - (2) 시약 및 위험물 등은 내용물의 이름, 위험성, 사용방법, 구입날짜, 사용자 이름 등을 실험실별로
시약관리대장을 만들어 기재하여야 한다.
 - (3) 시약 및 위험물 등은 실험에 필요한 양만을 배분토록 하고 사용 후 잔여량은 회수하여 지정된
장소에 다시 보관하여야 한다.
 - (4) 폐시약은 담당 실험실에서 폐시약 성분과 내용을 처리자에게 반드시 알려 처리 시
안전사고를
미연에 방지토록 하고, 실험폐기물 수거 시에 실험폐기물의뢰 전표를 작성하여 안전하게
폐기
처리하여야 한다.
7. 비상연락망 및 비상상황·사고발생시 행동요령
 - (1) 안전관리담당자는 안전사고 발생 시 사고 피해를 최소화하기 위해서 별지 제10호 서식에
의한
실험실의 비상 연락망과 비상시 행동요령을 출입구 또는 전화기 옆에 비치하여야 한다.
 - (2) 비상 연락망에는 안전관리담당자 및 종사자의 전화번호와 인근 소방서, 병원응급실의
전화번호가 반드시 기록되어 있어야 한다.
 - (3) 종사자는 실험실에서 사고가 발생하였거나, 사고 위험이 감지되었을 경우, 즉시
비상연락망과 비상 상황 시 행동요령에 의거 사고 수습조치를 하여야 한다.

4. 제 3 협동기관 (제주대학교)

가. 조직.

- 연구실안전관리위원회: 위원 및 임기 “붙임” 참조
- 연구실 안전환경관리자 지정: 2명(1명 전담)

- 안전환경관리자 지정 기준
 - 연구자수 1천명 이상 2명
- 안전환경관리자 지정 기준
 - 전담자 : 1인(상시 연구활동종사자 300인 이상)
 - 자 격 : 국가기술자격 중 안전관리분야 기사 이상의 자격 또는 안전관련 학과를 전공하고 졸업한 사람으로서 연구실 안전관리 업무에 실무경력이 있는 사람

※ 입법예고: 2015. 7. 1부터 연구활동 종사자 3,000명 이상인 경우, 안전환경관리자 3명 이상 지정해야 함

나. 안전관리 등급기준

등급	상 태
1	문제가 없고 안전성이 유지된 상태
2	경미한 결함이 발견되었으나 안전성에 영향은 없으며, 경미한 보수가 필요한 상태
3	결함이 2등급보다 취약하고 전체적인 안전에 크게 영향을 미치지 않는으나 일부 보수 및 보강이 필요한 상태
4	결함이 심하게 발생하여 긴급보수, 보강이 필요하며 사용에 제한을 하여야 하는 상태
5	심각한 결함이 발생하여 안전상 위험발생 가능성이 커서 즉시 사용금지 하고 개선해야 하는 상태

다. 연구실 안전관리 계획

※ 보험 가입 및 건강검진 대상자에 연구활동종사자가 누락되지 않도록 철저히 파악(위원회 주 문 사항)

○ 연구실 안전보험 가입

- 근거: 연안법 제14조(보험가입)
- 대상: 연구활동종사자(대학원생, 학부생, 연구원 및 연구보조원)

- 주요내용: 보상한도 사망/후유장해(1급) 1억원, 부상 1천만원
- 예산: 20,000천원(대학회계)

○ 연구활동종사자 건강검진 실시

- 근거: 연안법 시행령 제10조(건강검진의 실시)
- 검진대상: 위험·위해 화학물질을 취급하는 상시 연구활동종사자
(대학원생, 연구원 및 연구보조원 등)
- 검진종류: 특수건강검진
- 검진기간: 5월~9월(대학방문 검진은 검진기관과 협의 후, 별도 지정)
- 예산: 10,000천원(대학회계)

○ 연구실 정기점검 실시

- 근거: 연안법 제8조(안전점검의 실시)
※ 정기점검 년 1회 이상, 정밀안전진단은 2년 1회 이상
- 대상: 과학기술분야 연구실(400실)
- 점검기관: 한국소방안전협회
- 예산: 금18,750천원(대학회계)

○ 연구활동종사자 안전교육

- 근거: 연안법 시행규칙 제9조(교육·훈련의 시간)

구분	대상	시간	교육 내용
정기 교육·훈련	연구활동종사자	반기별 6시간 이상	· 연구실 내 유해·위험요인 및 안전한 연구개발활동에 관한 사항 등
신규채용	신규 채용된 연구활동종사자 (계약직 포함)	8시간	· 정기교육·훈련 내용 · 보호장비 및 안전장치 취급과 사용에 관한 사항 등 · 그 밖에 연구실 안전관리에 관한 사항
	신규참여 대학생·대학원생	2시간	

- 반기 6시간 이상 분야별(화학, 생물, 전기, 기계, 소방 등) 교육 제공
- 예산: 산학협력과 안전관리비
- 기타: 시설과에서 교육대상자 등록 및 관리

○ 폐수 및 폐시약 처리

- 폐수: 매월 기관(부서)로부터 폐수현황 확인, 시설과에서 수시 처리
- 폐시약: 처리 요구가 있을 경우, 기관별 현황 파악 후 연 1~2회 처리
※ 도내에 처리업체가 없기 때문에 폐수, 폐시약 양을 확인 후 처리
- 예산: 대학회계

제 9 장 참고문헌

- 강석권, 윤용덕, 정해운. 1997. 꿀벌응애류 및 질병방제기법에 대한 연구. 농림특정연구과제 보고서. 농림부.
- 강아랑·이명렬·이만영·김혜경·윤미영·최용수. 2015. *Bacillus thuringiensis*의 꿀벌부채명나방, *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae)에 대한 방제 효과. J. Apic. 30(4) : 275~280.
- 강영배, 김동성, 장두환. 1976. 꿀벌에 기생하는 *Nosema apis*의 병원성과 발육단계에 관한 연구. Korean J. Vet. Res. 16: 11-25.
- 김남숙, 이만영, 홍인표, 최용수, 김혜경, 이명렬, 이광길. 2010. 꿀벌 노제마병의 시기별 국내 발생 현황. 한국양봉학회지 25(1): 25-29.
- 김수연, 김창환, 김지현, 손원근, 황규계, 임윤규. 2013. 미국부저병 원인체(Paenibacillus larvae)의 편모 및 아포에 대한 단일클론항체. 한국양봉학회지. 28(5):339-344
- 박영미, 이명렬. 2004. 국내외 서양종 꿀벌에 기생하는 꿀벌응애의 유전자 분석. 한국양봉학회지 19:117-124.
- 백종희, 이종구, 윤병수. 2012. 꿀벌 유충에 의한 약제 감수성 평가 방법. Korean J. Apiculture 27(4) : 315~319
- 우건석, 이종호. 1993. 우리나라 꿀벌과 벌통에서 서식하는 응애류에 관한 연구 I. 한국양봉학회지 8:140-156.
- 우건석, 이종호, 조광선, 조영희. 1995. 꿀벌 해충(응애류 및 소충), 감염실태 및 방제대책에 관한 연구. 한국양봉학회지. 10: 35-48.
- 우리나라 양봉산업 위축 추이. 농협경제연구소 농림축산식품부. 2005년~2011년
- 유미선, Kim Cuc Nguyen Thi, 김동수, 김일욱, 권순환, 윤병수, 2008. Israel Acute Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. 한국양봉학회지 24:31-36.
- 유미선, 김을환, 강민희, 한상훈, 권순환, 윤병수. 2007. 국내 양봉장에서 Kashmir Bee Virus(KBV)의 검출과 이의 분자생물학적 고찰. 한국양봉학회지 22: 33-42.
- 유미선, 김일욱, 강민희, 한상훈, 윤병수. 2008a. Kashmir Bee Virus와 Israel Acute Paralysis Virus의 동시 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. 한국양봉학회지 23: 97-102.
- 유미선, 이동우, 김일욱, 김동수, 권순환, 임윤규, 윤병수. 2007. 한국산 꿀벌에서 Black Queen Cell

Virus의 검출. 한국양봉학회지 22(1): 43-52.

유미선, 조용호, 김일옥, 강민희, 권순환, 한상훈, 윤병수. 2008. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)을 이용한 꿀벌 바이러스 질병의 신속 검출법 개발. 한국양봉학회지 23: 185-190.

이명렬, 박영미, 이만영, 김영수, 김혜경. 2005. 가을철 꿀벌번데기에 기생하는 꿀벌응애와 중국가시응애의 밀도분포. 한국양봉학회지 20:103-108.

이명렬, 이만영, 김영수, 남성희, 장승중, 유철형. 2004. 꿀벌응애 억제 및 몇 가지 천연물의 꿀벌응애 방제 효과에 대한 예비평가. 한국양봉학회지 19:57-60.

이명렬, 최지영, 이만영, 김영수. 2003. 국내 꿀벌 노제마병 감염수준. 한국양봉학회지 18(2): 151-154.

이보람, 유미선, Nguyen Van Phu, 노지나, 윤병수. 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheera apis*의 검출법 개발. 한국양봉학회지 26: 103-111.

이승옥, 이동운, 추호렬. 2007. 꿀벌부채명나방 [*Galleria mellonella* (L.)] 사육을 위한 경제적 인공사료 개발. Korean J. Appl. Entomol. 46(3): 385-392.

이중구, 백준수, 윤병수. 2013. Polyprotein에 기반한 Sacbrood Virus(SBV)와 한국산 SBV의 분류. Korean J. Apiculture 28(5) : 373~378

이중구, 이보람, 윤병수. 2012. Loop-mediated Isothermal Amplification(LAMP) 법을 이용한 Kakugo Virus의 새로운 검출법 개발. Korean J. Apiculture 27(4) : 267~274

이혜민, 유미선, 김을환, 이동우, 한상훈, 윤병수. 2006. 백목병 원인균 *Ascospheera apis*의 Quick Real-time PCR 검출법. 한국양봉학회지 21: 107-112.

이혜민, 하정순, 조용호, 남성희, 윤병수. 2004. 꿀벌 진균성 질병의 신속 확인을 위한 *Ascospheera apis*, *Aspergillus flavus*의 PCR 검출법. 한국양봉학회지 19: 139-148.

임희영, 이순복, 윤병수. 2013. 열화상 사진 자료에 기반한 꿀벌 봉군의 생사 진단 방법에 대한 고찰. Korean J. Apiculture 28(1) : 57~62

임희영, 이중구, 윤병수. 2013. RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) 서열에 따른 IAPV 계통분류학적 고찰. Korean J. Apiculture 28(1) : 63~73

정진교, 이만영, 마영일. 2000. 1999-2000년 국내서 양봉꿀벌 양봉농가에서 꿀벌응애와 중국가시응애의 감염실태 조사. 한국양봉학회지 15:141-145.

- 정철의. 2009. 국내 적응형 꿀벌응애 개체군 동태 개발을 위한 기반 연구. 한국양봉학회지 24:67-74.
- 정철의, 김동원. 2008. 꿀벌 성충에 기생하는 꿀벌응애의 개체군 증가 모델 I. 지수증가모델. 한국양봉학회지 23:269-273.
- 정철의, 김동원, 김지원. 2014. 형태적 근거에 따른 국내 서식 중국가시응애 학명 변경. 한국양봉학회지 29:217-221.
- 주현희, 길성호.: 2013: 꿀벌세포의 세포배양에 적합한 성장 배양액 선별, 한국양봉학회지 28(5), 297~301.
- 최용수, 이명렬, 심하식, 김혜경, 변규호, 윤미영, 강아랑, 트란 반 또한, 홍인표, 우순옥. 2014. 꿀벌에 기생하는 꿀벌응애와 중국사이응애의 형태적 특성과 생태적 상호작용. 한국양봉학회지 29:327-332.
- 최용수, 이명렬, 이만영. 2007. 국내 꿀벌에서 Israel Acute Paralysis Virus 진단. 한국양봉학회지 22: 159-165.
- 최용수, 이명렬, 이만영, 김혜경, 이광길. 2008. 꿀벌, 화분 및 꿀에서 꿀벌 바이러스의 진단. 한국양봉학회지 23:251-258.
- 최용수, 이명렬, 이만영, 이광길. 2008. 국내 꿀벌에서의 바이러스진단 및 질병발생 현황 조사. 한국양봉학회지 23:153-159.
- 홍인표, 우순옥, 최용수, 한상미, 심하식, 김혜경, 한상훈, 이만영, 이명렬, 변규호, 하남규. 2012. 꿀벌 바이러스의 아카시나무 개화기 발생 현황. 한국양봉학회지 27(2): 117-121.
- A kelekar, MD Cole. Immortalization by c-myc, H-ras, and Ela oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses. Molecular & Cellular Biology. 1987, 7(11):3899-3907.
- Allen, M.F., Ball, B.V., 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World 77, 141~162.
- Amett, R. H. 1985. *Galleria mellonella*: In American Insects. published by van Nostrand Reinhold Company Inc. New York, USA. 570.
- Anderson, D.L. 1995. Viruses of *Apis cerana* and *Apis mellifera*, In The Asiatic hive bee: apiculture, biology, and role in sustainable development in tropical and subtropical Asia.

Enviroquest, Ltd., Cambridge, Ontario, Canada. p. 161–170

Anderson, D.L. and H. Giacón. 1992. Reduced pollen collection by honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies infected with *Nosema apis* and sacbrood virus. *J. Econ. Entomol.* 85: 47–51.

Anderson, D. L., and J. W. H. Trueman. 2002. *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 165~189.

Anderson, D.L. and M.J. Morgan. 2007. Genetic and morphological variation of bee-parasitic *Tropilaelaps* mites: new and re-defined species. *Exp. Appl. Acarol.* 43:1–24.

Aneta A. Ptaszyńska, Grzegorz Borsuk, Grzegorz Woźniakowski, Sebastian Gnat, Wanda Małek. 2014. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honeybees. *FEMS Microbiol Lett.* 357: 40–48.

Anne, V. H., Zachary, Y. H. and Walter, L. P. 2003. Effects of dietary transgenic Bt corn pollen on larvae of *Apis mellifera* and *Galleria mellonella*. *Journal of Apicultural Research.* 42(4): 77–81.

Arif B, Pavlik L. Insect cell culture: Virus replication and application in biotechnology. *J Invertebr Pathol.* 2013, 112:138–141.

B.Amati, T.D.Littlewood, G.I.Evan, H.Land. The c-myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *The EMBO Journal.* 1993, 12(13):5083–5087.

Bailey, L. 1967. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascosphaera apis* for larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Pathology and Microbial Control.* 162–167.

Bailey, L. 1968. Honey bee pathology. *Annu. Rev. Entomol.* 13:191–212.

Bailey, L. 1969. The multiplication and spread of sacbrood virus of bees. *Ann. Appl. Biol.* 63:483–491.

Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. 13:191–212.

Bailey, L., A. J. Gibbs, and R. D. Woods. 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology* 23:425–429.

Bailey, L. and B.V. Ball. 1991. *Honey Bee Pathology.* Academic Press, London.

Barbara GS, Grunewald B, Paute S, Gauthier M, Raymond-Delpech V. Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invert Neurosci.* 2008, 8: 19–29.

Bergem M, Norberg K, Aamodt RM (2006) Long-term maintenance of in vitro cultured honeybee (*Apis mellifera*) embryonic cells. BMC developmental biology 6:17

Bi CM, Shi-Qiang Zhang, Yong Zhang, Shu YP, Li Wang, Zhi-Xing An, Aladaer Qi, Ning Lv. Immortalization of bovine germ line stem cells by c-myc and hTERT. Animal Reproduction Science. 2007, 100:371-378.

Brc̣a'k, J., and O. Kralik. 1965. On the structure of the virus causing sacbrood of the honey bee. J. Invertebr. Pathol. 7:110-111.

Bu, R., Sathiapalan, R. K., Ibrahim, M. M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M. I., and Bhatia, K. 2005. Monochrome Light Cyclor PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. J. medical microbiology. 54: 243-248.

Burges, H. D. 1970. Stability of *Bacillus thuringiensis* in beeswax and bee comb. Proc. 4th Int. CoNoq. Iysect Pathol. Maryland. 214-218.

Burges H. D. and Bailey L. 1968. Control of the greater and lesser wax moths (*Galleria mellonella* and *Achroia grisella*) with *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 11: 184-19

Buttermore RE, Pomeroy N, Hobson W, Semmens T & Hart R. 1998. Assessment of the genetic base of Tasmanian bumble bees (*Bombus terrestris*) for development as pollination agents. Journal of Apicultural Research 37, 23~25.

Calvert, III P. 1982. Certan™, a bacterial insecticide for control of wax moth (a literature review). American Bee J. 122: 200-202.

Carletto, J., Blanchard, P., Gauthier, A., Schurr, F., Chauzat, M. P., and Ribière, M. 2013. Improving molecular discrimination of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. J. invertebrate pathology. 113.1: 52-55.

Caron, D. M. 1992. Wax moth. American Bee J. 132: 647-649.

Carruthers S. 2004. A bee's eye view. Practical Hydroponics and Greenhouses 77, 24~28.

Chang, J. H., Roh, J. Y., Je, Y. H., Park, H. W., Jin, B. R., Woo, S. D., & Kang, S. K. 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding d-endotoxin Cry1E. Lett Appl Microbiol. 26: 387-390.

- Chan MMY, Choi SYC, Chan QWT, Li P, Guarna MM, et al. Proteome profile and lentiviral transduction of cultured honey bee (*Apis mellifera* L.) cells. *Insect Mol Biol.* 2010, 19: 653–658.
- Charriere, J. D. and Imdorf, A. 1999. Protection of honey combs from wax moth damage. *American Bee J.* 139: 627–630.
- Charvet, R., M. Katouzian–Safadi, M. E. Colin, P. A. Marchand, and J. M. Bonmatin. 2004. Systemic insecticides: new risk for pollinator insects. *Ann. Pharm. Fr.* 62:29–35.
- CHI V. DANG. c–Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism. *Molecular and Cellular Biolog.* 1999, 19(1):1–11.
- Chin Bull Entomol 45:483–488
- Choi K, Lee J, Park C, Jeong J, Chae C: Comparison of the pathogenesis of single or dual infection with type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Comparative Pathology* 152:317–324, 2015
- Choi, Y. S., Byeon, G. H., Ratna, Y. and Lee, M. L. 2012. Transmission of Bee Virus in *Apis cerana* Hives by *Brachymeria ornatipes* and *Galleria mellonella*. *Korean J. Apiculture.* 27(2): 123–127.
- Colin, M. E., J. M. Bonmatin, I. Moineau, C. Gaimon, S. Brun, and J. P. Vermandere. 2004. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47:387–395.
- Collison E, Hird H, Cresswell J, Tyler C. Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health – a critical analysis. *Biological Review of Cambridge Philosophical Society.* 2015, doi: 10.1111.
- Colony Collapse Disorder. *Science.* 318: 283–287.
- Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffrey L, Lopez D, Pettis JS, Engelsdorp DV, Evans. JD. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS One.* 2012, 7(8): e43562.
- Cox–Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI. A metagenomic survey of microbes

in honey bee colony collapse disorder. 2007, *Science* 318:283-287.

Deans, A. S. C. 1940. Chokebrood. *Bee World*. 21: 46-51.

De Jong D. 1977. A study of chalk brood disease of honey bee. Cornell University, Ithaca, USA, M. Sc. Thesis.

Delaplane, K.S. and W.M. Hood. 1999. Economic threshold for *Varroa jacoboni* Oud. In the southeastern USA. *Apidologie* 30: 383-395.

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 van Engelsdorp, Abby L. Kalkstein, Andrew Drysdale, Jeffrey horticulture & food research institute of New Zealand.MAAREC. 2000. Integrated pest management for beekeepers.4.8

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 van Engelsdorp, 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 Meta-genomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*. 318, 283~287.

Dong BY, Fang YZ, Guo ZQ, Li XJ, Zhang Y, Bi KH. 1986. Study on Chinese sacbrood bee virus. *Apic China* 2:6-8

Do TD, Park C, Choi K, Jeong J, Nguyen TT, Nguyen DQ, Le TH, Chae C: Comparison of experimental infection with Northern and Southern Vietnamese Strains of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Comparative Pathology* 132:227-237, 2015

Do TD, Park C, Choi K, Jeong J, Vo MK, Nguyen TT, Chae C: Comparison of pathogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus between wild and domestic pigs. *Veterinary Research Communications* 39:79-85, 2015

Finlay CA. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular & Cellular Biology*. 1993, 13(1):301-6.

Flores, J. M., et al. 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*. 27: 185-192.

Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., and Pieniazek, N. J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp.

(Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European J. Protistology*. 32.3: 356–365.

Gallai Nicola, Michel SJ, Settele Josef, Vaissière Bernard E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*. 2008, 68:810–821.

Gascuel J, Masson C, Bermudez I, Beadle DJ. Morphological analysis of honeybee antennal cells growing in primary cultures. *Tissue Cell*. 1994, 26: 551–558.

Giang Thi Huong Luong and Byoung–Su Yoon. 2015. Over–expression and Purification of Recombinant 3C–like Protease from Black Queen Cell Virus in *Escherichia coli*. *Journal of Apiculture* 30(1) : 45~52

Giang Thi Huong Luong, Byoung–Su Yoon. 2015. Over–expression and Purification of Recombinant 3C–like Protease from Black Queen Cell Virus in *Escherichia coli*. *Journal of Apiculture*. 30(1):45–52.

Giang Thi Huong Luong, Hee–Young Lim and Byoung–Su Yoon. 2014. Over–expression and Purification of RNA Dependent RNA Polymerase from Black queen cell virus in Honeybee. *Journal of Apiculture* 29(3) : 173~180

Giang Thi Huong Luong, Joo–Seong Lee, So–Jung Yong and Byoung–Su Yoon. 2015. Development of Ultra–Rapid Reverse Transcription Real–Time PCR for Detection against Black Queen Cell Virus in Honeybee. *Journal of Apiculture* 30(3) : 171~179

Giauffret A (1971) Cell culture of Hymenoptera. In: C Vago. *Invertebrate Tissue Culture: Volume 2*. New York: Academic Press. pp.295–305.

Giauffret A, Quiot JM, Vago C, Poutier F. In vitro culture of cells of the bee. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1967, 265:800–803.

Giauffret A, Quiot JM, Vago C, Poutier F. In vitro culture of cells of the bee. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 1967, 265:800–803.

Gisselmann G, Warnstedt M, Gamerschlag B, Bomann A, Marx T et al. Characterization of recombinant and native Ih–channels from *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003, 33:1123–134.

Goblirsch MJ, Spivak MS, Kurtti TJ (2013) A cell line resource derived from honey bee (*Apis*

mellifera) embryonic tissues. PloS one 8:e69831.

Goka K., K. Okabe, S. Niwa, N. Nishioka, M. Yoneda. 2000. Parasitic mite infestation in introduced colonies of European bumblebees, *Bombus terrestris*. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 44: 47–50.

Goodwin S. and Steiner M. (1999) Background to a submission to Environment Australia. In: Workshop on Possible Introduction of Bumblebees (*Bombus terrestris*) for Pollination of Horticultural Crops in Australia (ed. R. E. Buttermore). Tasmanian Museum and Art Gallery, Hobart. Available from URL: <http://www.tmag.tas.gov.au/workshop/proceedings.html>

Grabensteiner E, Ritter W, Carter MJ, 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. *Jan*:8(1):93–104.

Grace, T.D. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature* 195: 788–789.

Hachiro, S. and Knox, D. 2000. Diagnosis of Honey Bee Diseases. USDA, Agricultural Handbook. 690; 61.

Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Rapid and sensitive detection of deformed wing virus in honeybee using ultra-rapid real time pcr. *Journal of Apiculture* 28(2) : 121~129

Hee-Young Lim, So-Jung Yong, Joong-Goo Lee, Mi Jung Ji, Ok-Min Lee and Byoung-Su Yoon. 2014. Development of Specific PCR Method for Detection of *Nosema apis* Based on Nucleotide Sequence. *Journal of Apiculture* 29(1) : 27~33

Hee-Young Lim. 2013. Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra-Fast High-Performance PCR (UF-HP PCR). *Korean J. Apiculture* 28(4):237–244

Herman, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53(2): 242–255.

Higes, M., R. Martin and A. Meana. 2006. *Nosema cerana*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe *J. Invert Pathol.* 92: 93–95.

Hingston A. B. (2005) Does the introduced bumblebee *Bombus terrestris* (Apidae) prefer flowers

of introduced or native plants in Australia? Australian Journal of Zoology 53, 29~34.

Hiroshi Kitani, Chisato Sakuma, Takato Takenouchi, Mitsuru Sato, Miyako Yoshioka, Noriko Yamanaka. Establishment of c-myc immortalized Kupffer cell line from aC57BL/6 mouse strain. Result in Immunology. 2014, 4:68-74.

H Ju, S Ghil. Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2015, 51(9):890-3.

Hood, W. M., Horton P. M. and McCreadie, J. W. 2003. Field evaluation of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) for the control of the wax moths (Lepidoptera: Pyralidae) in stored honey bee comb. J. Agric. Urban Entomol. 20: 93-103.

Hornitzky, Michael. Nosema diagnosis. 2009. PRIMEFACT 901.

Hui, Junhui Zhai, Liwang Cui, Stephen K. Hutchison, Jan Fredrik Simons, Michael Egholm, Jeffery S. Pettis and W. Ian Lipkin. 2007. A Meta-genomic Survey of Microbes in Honey Bee

Hung, A.C.F., H. Shimanuki and D.A. Knox. 1996. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome. Am. Bee J. 136: 731-732.

Hunter, W.B. 2010. Medium for development of bee cell cultures (*Apis mellifera*: Hymenoptera: Apidae). In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 46: 83-86.

HY Lim, JG Lee, SB Lee, OM Lee and BS 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

Im J, Kwon G, Kong D, Ghil S.: Identification of a warm-temperature acclimation-associated 65-kDa protein encoded by a temperature- and infection-responsive gene in the Kumgang fat minnow *Rhynchocypris kumgangensis*.: J Exp Zool A Ecol Genet Physiol. 2015 Nov 27. doi: 10.1002/jez.1997.

Jaehyuk Yang, Janet Han, Kyu-Kye Hwang, Yoon-Kyu Lim. 2015. Incidence of Wolf Teeth in Jeju Ponies and Jeju Pony Crossbreds. 한국임상수의학회지. 32(3):285-287.

Ji M, Cho B, Cho YS, Park SY, Cho SN, Jeon BY, Yoon BS. 2014. Development of a quantitative sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting the MPT64 antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Yonsei Med J. 55(3):746-52.

Jing Wang, Lin Ying Xie, Susan Allan, David Beach, Gregory J. Hannon. Myc activates telomerase.

Genes & Development. 1998, 12:1769–1774.

Joong-Goo Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. clarification of the korean sacbrood virus based on the analysis of RNA dependent RNA polymerase. Journal of Apiculture 28(4) : 229~236

Joong-Goo Lee, Mi-Jung Ji, Ok-Min Lee, Byoung-Su Yoon and Hee-Young Lim. 2014. Nucleotide Sequence-Based Distinguishment of Sacbrood virus (SBV) using PCR Method. Journal of Apiculture 29(1) : 43~49

Joong-Goo Lee, Phu Van Nguyen, Baek Jun Soo, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Detection of capsid protein of sacbrood virus in honeybee using monoclonal antibodies. Journal of Apiculture 28(2) : 113~120.

Joo-seong Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2013. Development of specific detection method for fungal pathogens in honeybee by loop mediated isothermal amplification. Journal of Apiculture 28(4) : 245~250

Joo-seong Lee, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2014. Over-expression and Purification of Peptidase-C3G protein of Deformed Wing virus. Journal of Apiculture 29(1) : 57~62

Joo-Seong Lee, So-Jung Yong, Hee-Young Lim and Byoung-Su Yoon. 2015. A Simple and Sensitive Gene-Based Diagnosis of *Aspergillus flavus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Honeybee. Journal of Apiculture 30(1) : 53~59

Ju H, Ghil S (2013) Selection of compatible growth media for cell cultrue of honey bee cells. Korean J Apic 28:297–301

Ju H, Ghil S. (2015) Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 51(9):890–3

Ju H, Ghil S.; Primary cell culture method for the honeybee *Apis mellifera*.; In Vitro Cell Dev Biol Anim.; 2015 Oct; 51(9):890–3. doi: 10.1007/s11626–015–9924–9. Epub 2015 Jul 3.

Jung C. 2015. Simulation of varoa mite impact on honeybee health under climate change scenario. JA .

Kalman, S., Kiehne, K. L., Libs, J. L., & Yamamoto, T. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. galleriae. Applied and environmental microbiology. 59(4): 1131–1137.

Kim, D. and C. Jung. 2010. Evaluation of chemical susceptibility of the ectoparasitic mite *Varroa*

destructor in honey bee. Korea J. Apic. 23:261–268. Korea J. Apic. 25:201–209.

Kim T, Park C, Choi K, Jeong J, Kang I, Park S-J, Chae C: Comparison of two commercial type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) modified live vaccines against heterologous type 1 and type 2 PRRSV challenge in growing pigs. Clinical Vaccine and Immunology 22:631–640, 2015

Kitagishi Y1, Okumura N, Yoshida H, Nishimura Y, Takahashi J, Matsuda S. Long-term cultivation of in vitro *Apis mellifera* cells by gene transfer of human c-myc proto-oncogene. In Vitro Cellular & Developmental Biology–Animal. 2011, 47(7):451–3.

Klee, J., A.M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D.Q. Tam, T.X. Chinh, F. Puerta, J.M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries and R.J. Paxton. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. J. Invert. Pathol. 96(1): 1–10.

Klein, AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen, C, Tscharntke T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc Roy Soc Lond B. 2007, 274, 303–313.

Komatsubara S, Mori K, Hatanaka M, Amagai T, Inaba K, Shimizu S, Muramatsu S. Immortalization of murine leukocytes by oncogenes. II. Phenotypic characterization of transformants immortalized by v-src or Ha-ras oncogenes: expression of B220, a B-cell lineage specific antigen. Microbiol Immunology. 1988, 32(8):869–75.

Kondreddy Eswar Reddy, 유미선, 김영하, 김남희, Mummadireddy Ramya, 정하나, Le Thi Bich Thao, 이희수, 강승원. 2016. Homology differences between complete Sacbrood virus genomes infected *Apis mellifera* and *Apis cerana* honeybees in Korea. Virus Genes. (in print).

Koppenhöfer, A. M., and H. K. Kaya. 2000. Interactions of a nucleopolyhedrosis virus with Azadirachtin and Imidaclopride. J. Invertebr. Pathol. 75:84–86.

Kreissl S, Bicker G. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. J Neurocytol. 1992, 21:545–556.

Kweon CH1, Nguyen LT2, Yoo MS3, Kang SW. 2015. Differential recognition of the ORF2 region in a complete genome sequence of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolated from boar bone marrow in Korea. Gene. 15:569(2):308–12.

Lee, H., T.M. Nguyen and J. Kim. 2015. Isolation of Soil Actinobacterial Strains Showing

- Antifungal Activity against *Aspergillus flavus*, a Causative Agent of Stonebrood Disease in Honeybee. *Journal of Apiculture* 30(1):31–35.
- Lee, J. and J. Kim. 2014. Control of Chalkbrood by using Actinobacterial Culture. *Journal of Apiculture* 29(1):21–26.
- Lee JS, Lee HJ, Moon BH, Song SH, Lee MO, Shim SH, Kim HS, Lee MC, Kwon JT, Fornace AJ Jr, Kim SU, Cha HJ. Generation of cancerous neural stem cells forming glial tumor by oncogenic stimulation. *Stem Cell Review*. 2012, 8(2):532–45.
- Lee ML. 벌들의 귀환. *한국양봉협회보*. 2009, 37–40.
- Li, R. S., Jarrett, P. and Burges, H. D. 1987. Importance of spores, crystals, and delta-endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *J. Invertebrate Pathol.* 50: 277-284.
- Liu, T. 1996. *Varroa* mites as carriers of honey bee chalkbrood. *Am. Bee. J.* 136: 655.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar W. J. and Smith, R. A. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible Diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1385-1389.
- Luscher B, Eisenman RN. *Genes Development*. 1990, 4:2025–2035.
- Lynn DE, Hung ACF. Development of continuous cell lines from the egg. Parasitoids *Trichogramma confusum* and *T. exiguum*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1991, 18: 99–104.
- Lynn DE, Hung ACF. Development of a continuous cell line from the insect egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *In Vitro Cell Dev Biol.* 1986, 22: 440–442.
- Lynn DE. Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003, 37: 319–321.
- MAF. 2001. A review of treatment options for control of varroa mite in New Zealand. 33p. The Rhein, W.V. 1933. Uber die Entstehung des weiblichen Dimorphismus im Bienenstaate. *Wilhelm Roux Archiv fur Entwicklungsmechanik der Organismen* 129: 601–665.
- Marutani–Hert, M., Hunter, W.B. and Hall, D.G. 2009. Establishment of Asian citrus psyllid

(*Diaphorina citri*) primary cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 45: 317–320.

Mayo, M. A. 2002. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Arch. Virol.* 147, 1655~1663.

Morrison BJ, Steel JC, Morris JC (2012) Sphere culture of murine lung cancer cell lines are enriched with cancer initiating cells. *PloS one* 7:e49752

Nam S. H., H. J. Yoon and S, E. Kim. 2003. Morphological characteristics of *Aspergillus Flavus* Link causing stonebrood disease in Korean native bumblebee, *Bombus ignitus*. *Korean. J. Api.* 18: 43–48.

Nguyen, T.M. and J. Kim. 2013. Selective isolation of actinobacteria showing antibacterial activity against *Paenibacillus* larvae from soil samples collected in South Korea. *Journal of Apiculture* 28(4):265–272.

Nguyen, T.M., H. Lee and J. Kim. 2015. Further Finding of Antimicrobial and Antifungal Activities against Human Pathogens by using the Isolates to Inhibit the Growth of *Paenibacillus* larvae, an Agent of AFB. *Journal of Apiculture* 30(1):37–44.

Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces fabae* sp. nov., a producer of antibiotics against microbial pathogens, isolated from soybean (*Glycine max*) rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:4151–4156.

Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces gilvifuscus* sp. nov., an actinomycete that produces antibacterial compounds isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:3493–3500.

Nguyen, T.M. and J. Kim. 2015. *Streptomyces olivicoloratus* sp. nov., an antibiotic-producing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:3262–3270.

Nguyen, T.M., V.H.T. Pham and J. Kim. 2015. *Mesorhizobium soli* sp nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek* 108:301–310.

Park C, Choi K, Jeong J, Kang I, Park S–J, Chae C: Concurrent vaccination of pigs with type 1 and type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) protects against type 1 PRRSV but not against type 2 PRRSV on dually challenged pigs. *Research in Veterinary Science* 103:193–200, 2015

Park C, Kang HS, Jeong J, Kang I, Choi Kim M–S, Kim Y–H, Kang S–W, Yoon B–S, Chae C: In

situ hybridization for the detection of sacbrood virus in infected larvae of the honey bee (*Apis serana*). Journal of Comparative Pathology (in print).

Park K, Nam Y, Choi Y (2014) An agarose gel-based neurosphere culture system leads to enrichment of neuronal lineage cells in vitro. In vitro cellular & developmental biology Animal, 10.1007/s11626-014-9855-x

Peter Neumann, Carreck NL. Honey bee colony losses. Journal of Apicultural Research. 2010, 49:1, 1-6.

Rameswor Maharjan and Chuleui Jung. 2015. Insecticide-mediated behavioral avoidance by bean bug, *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae). Entomological research 45: 184-192.

Rao K, Alper O, Opheim KE, Bonnet G, Wolfe K, Bryant E, O'Hara Larivee S, Porter P, McDougall JK. Cytogenetic characterization and H-ras associated transformation of immortalized human mammary epithelial cells. Cancer Cell International. 2006, 26(6):15.

Reddy KE, Noh JH, Choe SE, Kweon CH, Yoo MS, Doan HT, Ramya M, Yoon BS, Nguyen LT, Nguyen TT, Quyen DV, Jung SC, Chang KY, Kang SW. 2013. Analysis of the complete genome sequence and capsid region of black queen cell viruses from infected honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. Virus Genes. 47(1):126-32.

Rocher J, Ravallec M, Barry P, Volkoff AN, Ray D et al. Establishment of cell lines from the wasp *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae) containing the symbiotic polydnavirus *H. didymator* ichnovirus. J Gen Virol. 2004, 85: 863-868.

Romée van der Zee, Alison Gray, Lennard Pisa, Theo de Rijk, James C. Nieh. An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their association with *Varroa destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors. PLoS One. 2015, 8;10(7):e0131611.

Röseler, P-F. 2002. A scientific note on the reproduction of two bumblebee queens (*Bombus hypnorum*) infested by the nematode *Sphaerularia bombi*. Apidologie 33:423-424.

Ruffinengo S.R., M.D. Maggi, J.A. Marcangeli, M.J. Eguaras, J. Principal, C. Barrios, F. De Piano and M. Giullia. 2014. Integrated Pest Management to control *Varroa destructor* and its implications to *Apis mellifera* colonies. Zootecnia Trop. 32:149-168.

Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D et al. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. PLUS ONE. 2011, 6: e20656.

Sampat Ghosh and Chuleui Jung. 2015. Nutritional evaluation of four commercially available pollen patties in Korea. *Korea Journal of apiculture* 30: 155–160.

Schmid–Hempel, P. 2001. On the evolutionary ecology of host–parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*. 88:147–158.

Segura, N.A., Santamaria, E., Cabrera, O.L. and Bello, F. 2012. Establishment and characterisation of a new cell line derived from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 107: 89–95.

Semmens T. D., Turner E. and Buttermore R. (1993) *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) now established in Tasmania. *Journal of the Australian Entomological Society* 32, 346.

Shen MQ, Cui LW, Ostiguy N, Cox–Foster D. 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna–like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic *Varroa* mite. *J Gen Virol* 86:2281–2289

Shimanuki, H., N.W. Calderone and D.A. Knox. 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.* 134: 827–828.

Sohi SS, Ennis TJ (1981) Chromosomal characterization of cell lines of *Neodiprion lecontei* (Hymenoptera: Diprionidae). *Proc Entomol Soc Ont* 112: 45–48.

Stoltz, D., X. R. Shen, C. Boggis, and G. Sisson. 1995. Molecular diagnostic of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.* 34:153–165.

Storer RD, Stein RB, Sina JF, DeLuca JG, Allen HL, Bradley MO. Malignant transformation of a preneoplastic hamster epidermal cell line by the EJ c–Ha–ras–oncogene. *Cancer Research*. 1986, 46(3):1458–64.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Johnson M. W. and Heckel, D. G. 1994. Crossresistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the Diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4627–4629.

Tentcheva, D., L. Gauthier, S. Jouve, L. Canabady–Rochelle, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin, B. V. Ball, and M. Bergoin. 2004. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor*. *Apidologie* 35:431–439.

- Van den Brink SC, Baillie–Johnson P, Balayo T, Hadjantonakis AK, Nowotschin S, Turner DA, Martinez Arias A (2014) Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development* 141:4231–4242
- VanEngelsdorp D, Hayes J Jr, Underwood RM, Pettis J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One*. 2008, 3:e4071.
- Van Loveren, H., P. S. Ross, A. D. Osterhaus, and J. G. Vos. 2000. Contaminant–induced immunosuppression and mass mortalities among harbor seals. *Toxicol. Lett.* 15:319–324.
- Wahrman MZ, Zhu S. Haploid and diploid cell cultures from a haplo–diploid insect. *Invertebr Reprod Dev.* 1993, 24: 79–86.
- Wallner, K. 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30: 235–248.
- White, G. F. 1917. Sacbrood. U. S. Dep. Agric. Bull. 431:1–55.
- Wilson A. 1999. Bumblebee workshop presentation. In: Workshop on Possible Introduction of Bumblebees (*Bombus terrestris*) for Pollination of Horticultural Crops in Australia (ed. R. E. Buttermore). Tasmanian Museum and Art Gallery, Hobart. Available from URL: <http://www.tmag.tas.gov.au/workshop/proceedings.html>.
- Yan X, Han RC. 2008. Diagnostic technologies of common pathogens of honeybees in China.
- Yang GH, Zhang GZ, Du ZL. 1979. The pathogen identification of the Chinese Sacbrood bee larvae disease. *Apic China* 5:15–17
- Yoo, M. S., Noh, J. H., Yoon, B. S., Reddy, K. E., Kweon, C. H., Jung, S. C., et al. 2012. Reverse transcription loop–mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *Journal of Virological Methods.* 186(2):147–151.
- Yoon, H. J., and S. E. Kim. 2002a. Facilitating effect of helpers on oviposition and colony development of bumblebee queen, *Bombus ignitus*. *Korean J. Appl. Entomol.* 41:239–245.
- Yoon, H. J., Kim, S. E., Lee, K. Y., Lee, S. B., and Park, I. G. 2008. The Effect of Temperature Treatment on the Production of Worker or Queen Bumblebees. *Korean J. Apiculture* 23 (4), 293~287
- Yoon, H. J., S. E. Kim and Y. S. Kim. 2002b. Temperature and humidity favorable for colony development of the indoor–reared bumblebee, *Bombus ignitus*. *Appl. Entomol. Zool.* 37:419–423.

Yoon, H. J., S. E. Kim, S. B. Lee and I. G. Park. 2003. Effect of CO₂-treatment on oviposition and colony development of the bumblebee, *Bombus ignitus*. Korean J. Appl. Entomol. 42:139–144.

Yoon, H. J., Y. I. Mah, M. Y. Lee, I. G. Park and M. Bilinski. 1999. Ecological characteristics of *Bombus ignitus* Smith in Korea. Korean J. Appl. Entomol. 38:101–107.

Zapata Lesmes, A.C., Cardenas Castro, E. and Bello, F. 2005. Characterization of cell cultures derived from *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) and their susceptibility to infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Med. Sci. Monit. 11: BR457–464.

Zhang, X., Feng, Y., Ding, W.F., Chen, X.M., Wang, C.Y. and Ma, T. 2011. Establishment and characterization of an embryonic cell line from *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 47: 327–332.

Zhang, X., Feng, Y., Ding, W.F., Chen, X.M., Wang, C.Y. and Ma, T. 2012. Characterization of a new insect cell line that is derived from the neonate larvae of *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and its susceptibility to AcNPV. Tissue Cell 44: 137–142.