

발간등록번호

11-1543000-002173-01

수출전략기술개발사업 R&D Report

뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역 관련 기술들의 개발 최종보고서

2018 . 1. 31.

주관연구기관 / 경기대학교 산학협력단
협동연구기관 / 제주대학교 산학협력단

농림축산식품부

2. 제출문

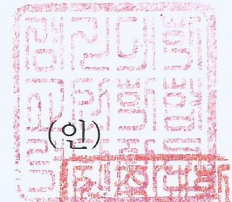
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역관련 기술들의 개발”(개발기간 : 2015. 12 .18 ~ 2017. 12. 17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018 . 01 . 31 .

주관연구기관명 : 경기대학교 산학협력단



협동연구기관명 : 제주대학교 산학협력단



참여기관명 : (주) 진시스템



주관연구책임자 : 윤 병 수

협동연구책임자 : 임 윤 규

참여기관책임자 : 서 유 진

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	115067-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2015.12.18. ~2017.12.17.	단 계 구 분	2년차/ 2년차
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역 관련 기술들의 개발			
연 구 책 임 자	윤 병 수	해당단계 참 여 연구원 수	총: 10 명 내부: 2 명 외부: 8 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:160,000천원 민간: 53,400천원 계:213,400천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 15 명 내부: 2 명 외부: 13 명	총 연구개발비	정부:320,000천원 민간:106,800천원 계:426,800천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	경기대학교 산학협력단 생명과학과			참여기업명 (주)진시스템	
위 탁 연 구	연구기관명: 없음.			연구책임자: 없음.	
연구의 목적 및 내용					
<p>본 연구는 뒤영벌의 병원체들을 신속하고 정확하게 검출/검량할 수 있는 방법들을 개발한 것으로, 이 검사법들은 뒤영벌의 생산과정에서 보건안전 및 질병제어의 도구로 사용하고자 하였으며, 또한 국가 간 뒤영벌의 수출입 활성화를 위하여, 현재 가장 큰 걸림돌이 되어 있는 생물학적 검역기준을 제정하고자 한 것이다.</p>					
연구개발성과					
<p>본 과제의 연구개발 성과는 뒤영벌의 병원체로 알려져 있는 SBPV, ABPV, <i>K.oxytoca</i>, <i>L.fusififormis</i> 등에 대한, 초고속 PCR을 이용한 신규 초신속 정량 검출법을 개발하였으</p>					

며, 이외 꿀벌의 병원체로 알려진 BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, *P.larvae*, *M.plutonius* 등에 대한 초고속 정량 PCR법을 뒤영벌 시료를 대상으로 적용시켰다.

이로써, 총13종에 이르는 뒤영벌 병원체들에 대한 초고속 유전자 검사법을 각기 완성하였으며, 아울러 1개 시료에 대한 13종의 병원체 검사를 일괄 초고속 PCR로 수행할 수 있는 실험법을 제정하였다.

또한, 총 13종의 뒤영벌 특이 병원체들에 대한 oligonucleotide기반 DNA-chip을 개발하였으며, 이를 통하여 보다 민감성 및 정확성이 뛰어난 뒤영벌 병원체의 검사법을 완성하였다.

확립된 뒤영벌류 병원체들에 대한 초고속 PCR은 수출입 검역에 바로 사용될 수 있도록 표준 검체와 함께 준비되었으며, 보다 정밀한 확정검사를 위하여 표준 검체와 함께 DNA-chip의 운용 지침도 제정하였다.

뒤영벌 병원체 특이 초고속 PCR법 및 특이 DNA-chip은 뒤영벌의 수출입 검역에 적합한 검역 도구 또는 지침으로 제정되기를 기대한다.

연구개발성과의 활용계획(기대효과)

뒤영벌 수출을 위한 검역방안의 확립, 이에 따른 실질적 수출의 가능성을 개척함. 이는 현재 수의과학검역본부와 상의 중이며, 현장 적용을 추진하고 있다.

뒤영벌 대량생산 중 질병제어를 위한 정성/정량 진단 키트 개발 및 상품화. 뒤영벌 병원체 특이 초고속 PCR법의 키트 생산은 (주)진시스템과 기술이전이 체결되었으며, 동 DNA-chip의 키트 생산은 (주)수젠텍과 상담 중임.

수출에 유리한 청정 뒤영벌 생산기술 확립 (무균, 무해충 서양뒤영벌)

4. 국문 요약문

		코드번호		D-01	
연구의 목적 및 내용	본 연구는 뒤영벌의 병원체들을 신속하고 정확하게 검출/검량할 수 있는 방법들을 개발한 것으로, 이 검사법들은 뒤영벌의 생산과정에서 보건안전 및 질병제어의 도구로 사용하고자 하였으며, 또한 국가 간 뒤영벌의 수출입 활성화를 위하여, 현재 가장 큰 걸림돌이 되어 있는 생물학적 검역기준을 제정하고자 한 것이다.				
연구개발성과	<p>본 과제의 연구개발 성과는 뒤영벌의 병원체로 알려져 있는 SBPV, ABPV, <i>K.oxytoca</i>, <i>L.fusiformis</i> 등에 대한, 초고속 PCR을 이용한 신규 초신속 정량 검출법을 개발하였으며, 이외 꿀벌의 병원체로 알려진 BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, <i>P.larvae</i>, <i>M.plutonius</i> 등에 대한 초고속 정량 PCR법을 뒤영벌 시료를 대상으로 적용시켰다.</p> <p>이로써, 총13종에 이르는 뒤영벌 병원체들에 대한 초고속 유전자 검사법을 각기 완성하였으며, 아울러 1개 시료에 대한 13종의 병원체 검사를 일괄 초고속 PCR로 수행할 수 있는 실험법을 제정하였다.</p> <p>또한, 총13종의 뒤영벌 특이 병원체들에 대한 oligonucleotide기반 DNA-chip을 개발하였으며, 이를 통하여 보다 민감성 및 정확성이 뛰어난 뒤영벌 병원체의 검사법을 완성하였다.</p> <p>확립된 뒤영벌류 병원체들에 대한 초고속 PCR은 수출입 검역에 바로 사용될 수 있도록 표준 검체와 함께 준비되었으며, 보다 정밀한 확정검사를 위하여 표준 검체와 함께 DNA-chip의 운용 지침도 제정하였다.</p> <p>뒤영벌 병원체 특이 초고속 PCR법 및 특이 DNA-chip은 뒤영벌의 수출입 검역에 적합한 검역 도구 또는 지침으로 제정되기를 기대한다.</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>뒤영벌 수출을 위한 검역방안의 확립, 이에 따른 실질적 수출의 가능성을 개척함. 이는 현재 수의과학검역본부와 상의중이며, 현장 적용을 추진하고 있다.</p> <p>뒤영벌 대량생산 중 질병제어를 위한 정성/정량 진단 키트 개발 및 상품화. 뒤영벌 병원체 특이 초고속 PCR법의 키트 생산은 (주)진시스템과 기술이전이 체결되었으며, 동 DNA-chip의 키트 생산은 (주)수젠텍과 상담중임.</p> <p>수출에 유리한 청정 뒤영벌 생산기술 확립 (무균, 무해충 서양뒤영벌)</p>				
중심어 (5개 이내)	뒤영벌 병원체	초고속 PCR	DNA-chip	뒤영벌 수출입	검역 검사

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	The aim of this research is development of rapid and accurate detection and quantification system against infectious pathogens which cause the major diseases in bumble bee. It would be also able to present a control method of disease-transmission in the process of production of bumble bee. And it would be helpful to establish a useful quarantine-test for export and import of bumble bee.				
Results	<p>In this research, we developed new detection methods using Ultra-Rapid (UR) PCRs against SBPV, ABPV, <i>K.oxytoca</i>, <i>L.fusiformis</i> in bumble bee. UR PCRs against oher pathogens including BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, <i>P.larvae</i>, <i>M.plutonius</i>, that were already known from honeybee, also tested using sample of bumble bee.</p> <p>Firstly, based on these UR-PCRs, we were able to complete a detection system against total 13 pathogens of bumble bee were in once..</p> <p>Secondly, we developed oligonucleotide based DNA-chip for the detection of bumble bee-pathogens. Totally, 13 different pathogens of bumble bee could be differently detected with quantitative manner. In addition, standard genes of 13 pathogens were also prepared. With these specific DNA, the standard experimental tests against each pathogen in bumble bee-diseases were also proposed.</p> <p>Bumble bee-pathogen specific UR-PCRs and DNA-chip, that we proposed, could be applied directly to quarantine-test for export and import of bumble bee.</p>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Application to experimental quarantine-test for export and import of bumble bee. ○ Application to tools of disease-control in the process of production of bumble bee with quantitative manner. ○ Establishment of process for mass-production of pathogen-free bumble bee for export of clean bumble bee. 				
Keywords	pathogens of bumble bee	Ultra-Rapid PCR	DNA-chip	export and import	quarantine test

6. 영문 목차

< CONTENTS >

Chapter 1. Introduction and summary of the research	10
1. Research objectives and Purpose	10
2. Need for research	10
3. Research performance	20
Chapter 2. The present technical state	28
1. Insect pollinators for horticultural crop in Korea	28
2. Development of detection kits against bee-pathgens	31
3. New detection method: development and application of RPA	35
Chapter 3. Research contents and Results	39
1. Development of Ultra-Rapid Reverse transcription PCR against Slow Bee Paralysis Virus (SBPV) in bumble bee	39
2. Development of Ultra-Rapid PCR against <i>Lysinibacillus fusiformis</i> in bumble bee	54
3. Development of Ultra-Rapid PCR against <i>Klebsiella oxytoca</i> in bumble bee	69
4. Development of Real-Time PCR against 11 pathogens of bumble bee	75
5. Development of Detection method using multiplex PCR and specific DNA-chip against 11 pathogens in honeybee	92
6. Development of Ultra-Rapid multiplex PCR against 6 pathogens in honeybee	110
7. Detection methods against <i>Ascosphaera apis</i> and <i>Aspergillus flavus</i> for the Stonebrood and Chalkbrood in honeybee	129
8. Development of Ultra-Rapid PCR against <i>Aethina tumida</i>	144
9. Development of Detection method using Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA) against Black queen cell virus	163
10. Development of Detection method using Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA) against pathogenic virus in honeybee	182
11. Development of multiplex Ultra-Rapid PCR against 13 pathogens of bumble bee and production of PCR-Chip	198
12. Development of oligonucleotide DNA-Chip against 13 pathogens of bumble bee and production of DNA-chip	230
13. Development of pathogen free bumble bee product	251

Chapter 4. Object achievement and related fields of their application	260
Chapter 5. Products of the research and their application-plan	262
Chapter 6. Scientific and technical Information of foreign countries	263
Chapter 7. Security level of Results on this research	267
Chapter 8. Research equipments and facilities	268
Chapter 9. Implementation Performance of Laboratory Safety Management	269
Chapter 10. Research Results in this research	274
Chapter 11. Patents and etc	300
Chapter 12. Reference	308

7. 본문목차

< 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
제 1 절. 연구개발의 목적	10
제 2 절. 연구개발의 필요성	10
제 3 절. 연구개발의 범위	20
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	28
제 1 절. 국내 화분매개 곤충 이용현황	28
제 2 절. 국내 꿀벌 질병 진단제의 시장 진입	31
제 3 절. 국외 새로운 유전자 진단방법으로 RPA의 대두	35
제 3 장. 연구수행 내용 및 결과	39
제 1 절. Slow Bee Paralysis Virus (SBPV) 신속 검출을 위한 초고속 역전사 중합효소 연쇄반응법의 개발	39
제 2 절. 초고속 유전자 증폭법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체인 <i>Lysinibacillus fusiformis</i> 의 신속검출법	54
제 3 절. 초고속 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 뒤영벌 병원체 <i>Klebsiella oxytoca</i> 의 신속 검출법 개발	69
제 4 절. 뒤영벌 병원체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법 개발 · 75	
제 5 절. 다중PCR증폭과 특이 DNA-chip을 활용한 꿀벌 주요 11종 병원체의 검출법 개발	92
제 6 절. 꿀벌 6종 병원체에 대한 초고속 다중 PCR 검출법의 개발	110
제 7 절. 꿀벌의 석고병, 백묵병 현장 진단을 위한 신속 <i>Ascospaera apis</i> 및 <i>Aspergillus flavus</i> 검출법 개발	129
제 8 절. 벌집꼬마밑빠진벌레 (<i>Aethina tumida</i>)의 신속검출을 위한 초고속 유전자 증폭법의 개발	144
제 9 절. 역전사 실시간 Recombinase Polymerase Amplification(RT/RT RPA)에 의한 꿀벌 Black queen cell virus의 신속 검출	163
제 10 절. 꿀벌 병원성 바이러스의 정량적 검출을 위한 정량 실시간 제조합효소-중합효소 증폭법의 개발	182
제 11 절. 뒤영벌 병원체에 대한 다중 실시간 초고속 PCR의 개발 및 PCR chip의 제품화	198

제 12 절 뒤영벌 병원체에 대한 다중 Oligonucleotide DNA-chip 개발 및 제품화	230
제 13 절 병원체 free 뒤영벌을 위한 system의 개발	251
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도	261
제 5 장. 연구결과의 활용계획	263
제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	264
제 7 장. 연구개발결과의 보안등급	267
제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	268
제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	269
제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	274
제 11 장. 기타사항	300
제 12 장. 참고문헌	308

<별첨> 자체평가의견서

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

제 1 장. 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1 절. 연구개발의 목적

본 과제는 뒤영벌류의 질병들 및 병원체들을 조사, 연구, 정립하고, 이들을 빠르고, 정확하게 검색할 수 있는 방법을 개발함으로써, 뒤영벌의 생산 및 질병제어, 그리고 수출입관련 검역에 보다 현실적인 실험방법을 제시하는 것을 최종 목표로 하며, 아울러, 뒤영벌의 보건위생을 체계화 할 수 있는 청정(무균, 무충) 생산 시스템 구축기술을 확립하고자 하였다.

주요 개별적 연구 목적은;

- 1) 뒤영벌의 질병진단을 위하여, 선행 개발된, 꿀벌의 진단에 사용되고 있는 모든 유전자 검사법을 적용하고, 활용 가능한 것들과 변형을 필요로 하는 것들을 파악하고,
- 2) 변형을 필요로 하는 것들은, 뒤영벌류로부터 해당 유전체를 유전자 재조합법으로 확보하여, 새로운 유전자 검사기법을 개발하고, 이와 별도로 뒤영벌류 특이의 병원체들을 발굴, 정성/정량이 가능한 별도 검사기법을 개발하고,
- 3) 확립된 뒤영벌류 전체 병원체들에 대한 유전자 검사기법들을 통합하여 일괄 검사체계를 확립하며,
- 4) 이들 학문적, 기술적 성과를 기반으로 뒤영벌의 수출입 검역기준을 새롭게 정립시키는 것을 추진하며,
- 5) 수출산업을 위한 무균, 무충의 청정 생산기술을 확립하고자 하였다.

제 2 절. 연구개발의 필요성

가. 연구개발 배경 및 현황

(1) 연구개발 배경

- 최근 지구온난화에 따른 기후변화, 환경오염, 농약의 과다사용에 따른 화분매개곤충의 감소로 작물 수정에 대한 위기감이 고조됨에 따라 화분매개곤충의 중요성이 재인식 되고 있음.

- 화분매개곤충의 경제적 가치('05)는 전 세계 농산물 생산액의 9.5%인 약 2천억 달러('11, Pesticide Action Network North America)
- 화분매개곤충들이 사라지면 그 손실은 2,449억-3,995억 달러에 달할 것으로 전망('09, INRA)

(2) 국내·외 개발 현황

< 국외 현황 >

- 전 세계적으로 뒤영벌 시장 확대
 - 30천 봉군('89) → 600천 봉군('00) → 100봉군('04) → 140봉군이상 추정('13)
 - 이중 반수 이상이 북유럽에서 사용되고, 한국, 일본, 중국, 대만, 칠레, 아르헨티나, 우루과이, 멕시코 및 튀니지에서 일부 수입, 사용 중(Velthuis and Doorn, 2006)
- 네덜란드, 벨기에, 이스라엘, 뉴질랜드는 주요 뒤영벌 수출국이며, 캐나다, 미국, 호주는 대체로 자급자족하고 있는 실정
- 최근에는 스페인(Agrobio)의 생산량이 급증

< 국내 현황 >

- 국내의 경우, 1994년 2,300봉군의 서양 뒤영벌의 수입을 시작으로, 2003년까지 30,000봉군 네덜란드, 벨기에, 이스라엘 등에서 진량 수입
- 1990년 말부터 뒤영벌 연중 대량생산 기술 개발, 2004년부터 개발된 기술이전 시작
- 국내 뒤영벌 시장 현황
 - 국내 뒤영벌의 생산업체는 2002년 그 존재함을 볼 수 없었으나, 2013년, 12개 업체 및 2개 지자체에서 비교적 다양한 제품을 생산하고 있음.

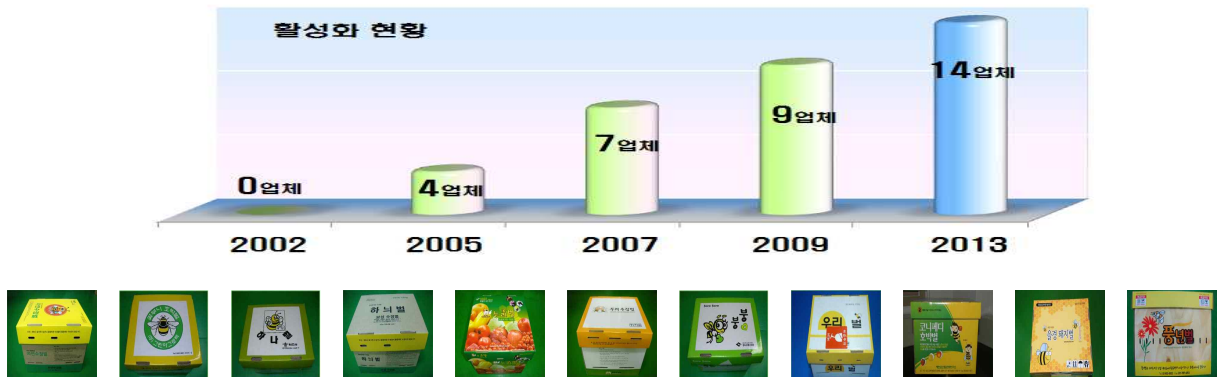


Fig. 1. 년도별 국내 뒤영벌 생산 기업수의 증가 및 대표적 뒤영벌 생산품들(농진청 기술이전)

- 한편, 국내생산 뒤영벌 시장점유율은 기술개발에 따라 급격히 높아졌으며, 이는 2005년 50%를 기점으로, 2013년 87%, 2014년 90%에 이르고 있음(Fig. 2).

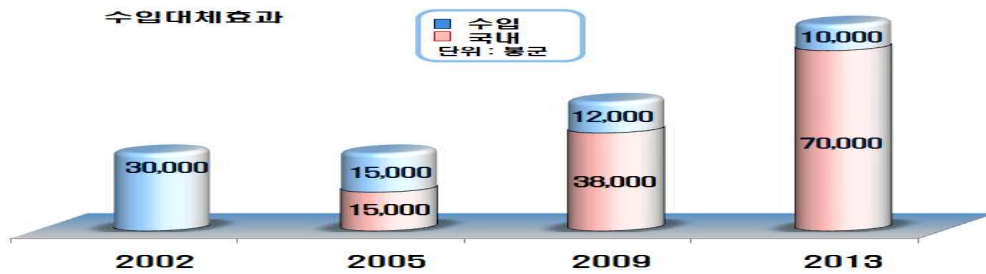


Fig. 2. 연도별 국내 생산 뒤영벌 생산 봉군수 및 시장점유율

- 뒤영벌 생산에 대한 국내 기술 및 산업이 발전됨에 따라 국내에서 유통되는 뒤영벌의 가격(천원/봉군)도 극적으로 하락하게 되었으며, 1997년 25만원의 수준에서 2013년 6만원대로 가격하락이 있었으며, 이는 계속적 기술의 개발로 더욱 가격이 하락되며, 활용의 폭이 넓어질 것으로 기대됨(Fig. 3).



Fig. 3. 연도별 뒤영벌 봉군 당 유통가격의 하락

※ 참고사항: 화분매개곤충 뒤영벌의 사육기술 개발의 경제적 파급효과: 3조 304억원(30년간)

- 화분매개곤충 뒤영벌 사육기술 개발 보급효과에 대한 기술가치 평가결과, 3조 304억원의 경제적 효과가 있다고 발표함(농진청 기술경영과, 2010년)
- 기술가치: 18억 41백만원(신기술 기술기여도 24.4% 적용)
- 기술의 주요특징으로는 생산성 향상 및 노동력 절감(인공수분대비 93%이상)

※ 참고사항: 국내 토종벌의 경우, 2010년 발견된 한국산 낭충아부패병 바이러스(kSBV), 1종에 의하여, 2015년 현재, 국내 토종벌의 95%이상이 소멸되었으며, 정부의 지원하에 토종벌 종보전사업이 전국적으로 진행됨. 그러나 토종벌 관련 산업은 거의 괴사되어가고 있으며, 2005년 40만 봉군의 국내 토종벌은, 2015년 현재 1만군 수준으로 추산되고 있음.

나. 본 연구개발의 필요성

- 농과원 뒤영벌 사육기술개발로 현재 국내 12개 생산업체 및 지자체 등에서 서양뒤영벌 생산판매(2013)
- 국내생산 뒤영벌의 90%이상의 보급률과 공급가격이 인하 등으로 시장 확대 필요

표 1. 한국과 이스라엘의 뒤영벌 이용기술 개발 및 시장 비교

구 분	한 국	이스라엘
대량증식	· 전기 온돌원리 대량증식시스템	· 자체 대량증식 시스템기술보유
이용작목	· 사과 등 과수 13개 작목 · 토마토 등 채소 11개 작목 · 대파 등 채종용 3개 작목	· 주로 토마토 등 채소작물에 이용 - 일부 과수 이용
시장	· 80,000만 봉군 생산, 국내시장 60억 규모, · 해외수출 없음	· 100,000만 봉군 생산, · Biobee 등 다국적 업체로 해외수출

※ 참고사항: 서양뒤영벌 관련 세계 및 국내 시장 현황

(세계) 시장규모는 1천억원(130만 봉군) 수준: 네덜란드·벨기에 3개사(Bio-best, Koppert, Bio-bee)가 전세계의 90%를 점유

(국내) 9개 업체가 수정벌(서양 뒤영벌) 생산 중이며, 시장은 60억원(8만봉군) 규모로, '08년 소규모(12봉군) 수출 이후 수출 실적 없음. 뒤영벌 증식 및 이용기술: 국내와 기술 격차 없으나 해외시장개척 부분은 크게 미진함.

다. 국내 뒤영벌 수출시 제약 요인

(1) 뒤영벌 생산의 기술개발 부분

- 생산성 향상을 위한 저렴한 **우수 여왕벌 확보** 필요
 - 여왕벌 구입가격 추이 : ('14) 1,500 → ('15) 3,000원/마리
 - 국내 화분가격 상승 : ('10) 15,000 → ('14) 27,000원/kg
- 수출 운송 시 안전하고 간편한 뒤영벌 먹이(설탕물) 개발
 - 설탕물의 흘림 등을 방지하기 위해서 **액상먹이(시럽형태)** 개발 필요

(2) 뒤영벌의 생산기술 부분

- 생산규모 증대를 통한 대량생산으로 **기본 수출물량 확보** → 생산성 향상
- 생산 및 판매용 벌통 규격 통일 등 제품 **품질기준 확립** → 상품성 향상
- 수출 포장방법 개발 : 운송 중 먹이공급, 환기, 온도 제어 등(코퍼트 등 해외선진사의 경우 파렛트 단위 포장으로 **수출포장 규격화** 실현)

(3) 뒤영벌 산업의 물류 부분

- **(운송비)** 살아있는 생물의 특성상 항공운송을 통한 빠른 배송이 중요하여 관련 운송비가 높은 상황
 - 국내 수입시 선적 후 3일 이내 국내도착)
- **(운송방법)** 일본, 중국을 제외한 국가*는 운송편 확보가 어려움
 - 카자흐스탄, 우즈베키스탄 등은 ‘대한항공’을 통한 운송만이 가능함
- **(수출 포장 프로세스)** 운송 중 발생할 수 있는 예상 못한 손실 방지를 위한 포장 프로세스 구축 필요
 - 운송 중 먹이 공급, 환기, 온도 제어 등

(4) 뒤영벌 수출입에 관한 검역 관련부분

- 수출관련 **국내 검역절차 미흡** : 검역서류 발급이 **비현실적으로 어려움**
- 국가별 수정벌 관련 검역 **협정 수립** 필요
 - 중국 : 검역 허가된 업체만이 수출가능(Koppert, Biobest사 검역협정체결)
 - 일본 : 수입허가를 취득해야만 수출 가능

※ **참고사항:** 꿀벌 수출입 조건에 관한 법률(법), 시행령(영), 지침 들.

- **꿀벌 수입위생 조건 고시**(농림축산식품부 고시 제 2013-191호):

“한국으로 수출되는 꿀벌은 아프리카벌 또는 아프리카벌 교배종, 꿀벌기문응애가 존재하거나 의심스러운 지역이 아닌 호주, 뉴질랜드, 덴마크, 화란, 헝가리, 일본, 미국(하와이주에 한함)에서 부화하여 사육된 것이어야 하며, 수출꿀벌은 다음 각 조건을 만족시키는 것이어야 한다 (개정 : 고시 1995-63호)”라 하였고, 이하와 같이 그 조건을 열거하였다.

1. 수출국 정부 수의기관은 다음의 조건에 부합되는 양봉장을 한국으로 꿀벌을 수출하려는 양봉장으로 허가하여야 한다.
 - 가. 수출검역 개시 전 수출국 정부수의기관의 정기적인(1년간 2회 이상) 위생검사(현장검사 및 실험실검사 등)와 감시·감독을 받는 곳이어야 한다.
 - 나. 수출검역개시전 최소 2년간 반경 50km이내에 위험로운 응애류 (*Acarica spp.*, *Varroa spp.*, *Tropilaelaps spp.*등)가 발생한 사실이 없는 곳이어야 한다.
 - 다. 수출검역 개시 전 최소 2년간 반경 10km이내에 아메리카부저병(American foulbrood disease), 유럽부저병(European foulbrood disease), 노제마병(Nosemosis of bees), 백묵병(Chalkbrood disease), 낭충봉아부패병(Sacbrood) 및 꿀벌마비증(Bee paralysis)이 발생한 사실이 없는 곳이어야 한다.
 - 라. 수출국 정부수의기관에 의해 위생관리를 받지 않은 태양봉장으로부터 꿀벌, 꿀벌생산물 또는 장비 등을 반입하지 아니하며 꿀벌의 전염성 질병의 발생 의심이 있을 때 즉시 수출국 정부수의기관에 신고하는 곳이어야 한다.
2. 꿀벌 수입위생조건의 시행 및 적용과 관련하여 필요하다고 인정되는 경우, 한국검역관이 수출국에 대하여 현지검역을 실시할 수 있으며 이때 수출국 정부는 현지검역에 적극 협조하여야 한다.
3. 수출국 정부수의기관은 성숙된 꿀벌(여왕벌, 수벌, 일벌)에 한하여 수출을 허가하여야 한다.
4. 수출국 정부수의기관은 한국으로 수출하려는 허가된 양봉장의 벌군에 대하여 수출선적전 30일 이내에 <별첨> 질병에 대한 검사를 실시하여 이상이 없는 꿀벌만을 수출하도록 허가하여야 한다.
5. 한국으로 수출하려는 꿀벌의 수송을 위한 상자는 사용하지 아니한 새로운 재료를 사용하여 꿀벌이 외부로 유출되지 아니하도록 견고하게 제작된 것이어야 하며, 수송상자 속에는 벌집이 들어가서는 아니되고, 외부에서 내부를 용이하게 관찰할 수 있고 먹이공급을 쉽게 할 수 있어야 한다. 또한 수송상자의 외부에 농장별로 일련번호를 기재하여야 한다(개정 : 고시 1994-17호, □.3.10).

6. 수출양봉장의 시설 및 장비, 한국으로 수출할 꿀벌의 수송에 이용되는 수송차량, 선박 및 항공기는 수출국 정부가 인정한 소독액으로 소독되어야 하고 수송 중에 한국으로 수출되는 꿀벌 이외의 것과 혼재되어서는 안 된다.
7. 수송 중에 사용하는 꿀벌의 먹이는 수출국 양봉장에서 생산된 것이어야 하며, 위생적이며 꿀벌의 전염성 질병에 오염되지 아니한 것이어야 한다.
8. 한국으로 수출되는 꿀벌은 수출국으로부터 한국에 직송되어야하며, 급유 등의 이유로 기착(항)하는 것은 예외로 하되 꿀벌의 전염성 질병의 병원체에 오염될 우려가 없어야 한다.
9. 수입꿀벌의 검역 결과 제4호 별첨 질병이외에 **위해로운 것으로 인정되는 꿀벌의 전염성 질병 및 내·외부 기생충이 진단 또는 검출되었을 경우**에 반송 또는 폐기할 수 있다
(신설 : 고시 1994-17호)
10. 수출국 정부검역관은 다음 사항에 대하여 기재한 위생증명서를 발행하여야 한다.
 - 가. 수출 꿀벌의 종류 (여왕벌, 수벌, 일벌로 구분), 품종, 수량 및 특징과 포장재료 및 포장 수량, 이하
 - 나-아까지 생략, 이하 부칙 생략함“
 덧붙여, 위의 별첨에는 아래와 같은 질병명과 검사방법을 열거하였다.

표 2. 꿀벌의 질병명과 검사방법 (농림축산식품부 고시 제 2013-191호, 별첨)

질 병 명	검 사 방 법	검사결과
아카리아응애감염증(Acariasis of bees)	현미경 검사	음성
바로아응애감염증 (Varroasis)	진드기 분리	음성
트로필래랍스응애감염증 (<i>Tropilaelaps</i> spp.)	현미경 검사	음성
아메리카부저병(American foulbrood disease)	현미경 검사, Holst Milk test, 균분리 배양법	음성
유럽부저병(European foulbrood disease)	현미경 검사, 균분리 배양법	음성
노제마병(Nosemosis of bees)	현미경 검사	음성
백묵병(Chalkbrood disease)	균분리 배양법	음성
낭충봉아부패병(Sacbrood)	임상검사 또는 수출국에서 실시하는 방법	음성
꿀벌마비증(Bee paralysis)	임상검사 또는 수출국에서 실시하는 방법	음성

또한, 뒤영벌류에 관하여는 제시된 법, 영, 지침은 다음과 같았다.

※ 참고사항: 뒤영벌류 수출입 관련 법규 등

○ 농림축산검역본부 고시 제 (2015.9.16.) 에 뒤영벌(*Bombus terrestris* (Linnaeus)) 이 포함됨.

표 3. 금지품에서 제외되는 해충(농림축산식품부 고시 제 2015-25호, 발췌함)

번호	학 명	한국명	수입 용도	비 고
1	<i>Bombus terrestris</i> (Linnaeus)	서양뒤영벌	화분 매개용	수입하고자 하는 자는 농림축산검역본부 고시 제2013-103호 「금지품에서 제외되는 해충 결정을 위한 위험분석 및 수입검역요령」에 따라 검역 신청하여야 함

또한, 농림축산검역본부 고시 제 2013-103호(2013.3.13). “금지품에서 제외되는 해충 결정을 위한 위험분석 및 수입검역요령”은, 그 위험분석과 수입검역요령을 규정하고 있으며, 제6조(수입검역신청)에서, “① 금지품에서 제외되는 해충을 수입하고자 하는 자는 수입지를 관할하는 농림축산검역본부 지역본부장 및 사무소장(이하 “지역본부·사무소장”이라 한다)에게 식물방역법시행규칙 별지 제4호 서식에 의한 수입신고 및 검역신청서와 수출국의 공공기관에서 발행한 동·식물위생증명서(Veterinary / Phytosanitary Certificate) 또는 실물확인증(Certificate of purity / identity)(연구용의 경우 수출국의 생산자가 발행한 실물확인증 또는 해당 해충으로 실험하거나 사육하였음을 증명할 수 있는 연구논문으로 대신할 수 있다)를 제출하여야 한다.”라고 하였다.

제7조(검역방법)에서는 “① 지역본부·사무소장은 제8조의 규정에 의한 검역신청이 있을 때에는 식물검역관으로 하여금 다음 각 호의 사항에 대하여 검사하게 하여야 한다.

1. 당해 해충이 금지품에서 제외되는 해충인지 여부
2. 기생생물 등 다른 해충의 혼입여부
3. 사육재료(먹이, 부엽토 등)에 금지품 혼입여부
4. 해충이 비산되지 않도록 용기에 넣거나 포장하여 수입하는지 여부
5. 제5조제2항에 의한 별도조건 충족 여부

② 식물검역관은 다음 각 호의 어느 하나에 해당하는 경우에는 **사육 후 동정하여 검사**하여야 한다. 이 경우 수입자는 별지 제3호 서식의 금지품에서 제외되는 해충 사육신청서를 제출하고 사육에 필요한 먹이 등 모든 재료를 제공하여야 한다.

1. 금지품에서 제외된 해충으로 고시된 후 처음 수입된 미성숙 발육단계의 해충을 검사하는 경우
2. 처음 수입된 국가 또는 생산회사의 미성숙 발육단계 해충을 검사하는 경우

③ 식물검역관은 해충이 담긴 **포장(상자·용기 등)의 2%이상을 검사표본으로 채취한 후 당해 포장 내 유용동물의 10%이상을 추출하여 정밀검사를 실시**한다. 다만, 용기 개봉시 오염물질 등에 감염될 우려가 있는 시험연구용곤충은 실물 확인 후 검사를 생략할 수 있다.”고 하였다.

또한, 제11조(수입자의 의무)에서 “수입자는 금지품에서 제외된 해충으로 인한 제10조 등의 문제가 발생될 때에 대비하여 역 추적이 가능하도록 농림축산검역본부에서 요구하는 경우 해충의 국내 사용현황에 대한 정보를 제공하여야 하며, 금지품에서 제외된 해충으로 인한 문제점을 발견한 때에는 국내농업환경 및 자연환경의 피해를 최소화하기 위하여 이를 농림축산검역본부에 즉시 통보하고 문제해결을 위하여 협조하여야 한다.”라 하여 의무사항을 강조하였다.

한편, 식물방역법[법률 제13141호, 2015.2.3.]에서는 “수출입 식물과 국내 식물을 검역하고 식물에 해를 끼치는 병해충을 방제하기 위하여 필요한 사항”을 규정하고, 제7조의 2 및 3에 식물검역관 및 그 권한에 대하여 규정하였으며, 제18조(검역의 방법 등), 제28조(식물등에 대한 수출검역), 제31조의 2 및 3 (식물방제관 및 그의 권한등)은 본 과제인 “뒤영벌류 수출입”에 대하여 많은 참고사항을 제시하고 있다.

또한, 식물방역법 시행규칙(농림축산식품부령 제129호, 2015.1.6.)은 상기 식물방역법을 시행하고자 만든 것으로, 제4조(검역병해충), 제5조(규제비검역병해충), 제6조(병해충위험분석의 방법 등)등은 방역을 위한 절차 등을 규정하고 있으나, 각 대상(예; 뒤영벌류)에 대한 세부적 검사 방법등은 아직 정확한 규정 또는 실험지침 등을 찾을 수가 없었다.

상기의 법률적 검토를 종합하면, 뒤영벌, 꿀벌류 수출입의 현실적으로 이를 넘어서는 것이 매우 어려운 상황이며, 뒤영벌의 원활한 수출입을 가로막는 가장 큰 장벽은 바로 국내 검역의 장벽이 아닐까하는 의문이 들게 하였다.

라. 뒤영벌류 수출입을 위한 뒤영벌의 질병, 병원체 및 검사방법에 관한 연구: 그 필요성

뒤영벌류 중 가장 잘 알려진 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)과 호박벌(*B. ignitus*)에 대한 병원체 및 질병들에 대하여 현재 알려진 바는 많이 없으며, 꿀벌들 중 가장 많이 연구된 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에서 발견된 질병들 및 병원체들의 일부가 뒤영벌류에서도 일부 존재함이 확인되어 있다.

남성희 등(2003)은 호박벌(*B. ignitus*)에서 석고병균인 *Aspergillus flavus*의 존재를 확인하였으며, 김원태 등(2008)은 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)과 호박벌(*B. ignitus*)에서 병원성 세균의 분리를 시도하여, 서양뒤영벌 유래 세균으로 *Bacillus fusiformis* (치사율, 35~40%)와 *Klebsiella oxytoca*를 제시하였으며, 호박벌 유래 세균으로 *Pantoea dispersa* (치사율, 35~40%)와 *K. oxytoca* (치사율, 35~40%)제시한 바 있다.

한편, 꿀벌에서 발견된 병원성 바이러스를 기준으로 하여, 최 등(2009a)은 서양뒤영벌에서 국내 최초로 Deformed Wing Virus (DWV)의 존재를 확인하였으며, 바로 이어 호박벌에서도 DWV가 존재함을 보여주었다(최 등, 2009b). 이어 최 등(2010)은, 서양뒤영벌에서 7종(DWV, IAPV, BQCV, CWV, CBPV, SBV, KBV)의 꿀벌바이러스가 존재함을 확인하였으며, 호박벌에서도 KBV를 제외한 나머지 6종의 존재를 확인한 바 있다.

그리고, 이대원 등(2013)은 서양뒤영벌 야외개체군에서 *Nosema ceranae*의 특이 염기서열을 검출하였음을 보고하였다.

상기의 연구 결과들은, 서양 뒤영벌과 호박벌이 꿀벌에서 알려진 병원성 세균, 병원성 진균, 내부 기생성 진균(*Nosema ceranae*)등에 상당한 감수성이 있음을 보여주며, 꿀벌에서 발견된 병원체 중 아직 확인되지 않은 것들은 뒤영벌에 대한 연구의 부족에 의해 현재까지 미발견된 것이 아닌가 추론된다.

뒤영벌류의 수출입 절차는 비교적 근래 발전된 화분매개용 뒤영벌류의 신규 교역에 따라 새로이 요구되고 있는 것이다. 앞에 열거한 논문들에서, 뒤영벌류의 질병, 병원체에 대한 지식은 매우 일천하며, 또한 법률 및 규정들에서 가장 잘 알려진 꿀벌류의 수출입 절차도 매우 전 근대적인 수준에 머물고 있는 것으로 파악되며, 특히 뒤영벌의 그것에 관하여는 수출의 준비 뿐 아니라, 대량생산을 위한 질병제어의 기법도 매우 미흡함을 발견하게 된다.

본 과제에서는 뒤영벌류의 수출입을 위한, 관련 질병 및 병원체를 조사, 연구, 정립하고, 이들을 빠르고, 정확하게 검색할 수 있는 방법을 개발함으로써, 원론적 수준에 머물고 있는 뒤영벌의 수출입관련 검역과정을, 국내 관련기업들이 선도적으로 수출을 주도할 수 있도록, 보다 과학적이고, 합리적인 것으로 진보시키고자 한다. 아울러 우수 여왕벌 육성기술을 개발하고, 뒤영벌의 보건위생을 체계화 할 수 있는 청정(무균, 무해충) 생산 시스템 구축기술을 확립하여, 국내의 뒤영벌 산업이 수출대체 수준을 넘어서 국제적 산업기반을 만드는데 기술적 조력을 다하고자 하였다.

제 3 절. 연구개발의 범위

뒤영벌의 보건 안전 및 생물학적 검역방법 설정을 위한, 뒤영벌 소재 병원체 검출 및 검량 기법의 개발

이는 뒤영벌류의 질병들 및 병원체들을 조사, 연구, 정립하고, 이들을 빠르고, 정확하게 검색할 수 있는 방법을 개발하는 것을 목표로 하며, 이로써 뒤영벌의 생산과정에서 질병제어, 그리고 수출입관련 검역에 보다 현실적인 실험방법을 제시하고자 하였다.

연구개발의 세부 내용은;

(1) 꿀벌의 질병진단에 사용되고 있는 유전자 검사법을 뒤영벌의 질병진단에 적용

현재 전체 벌류에서 가장 많은 연구가 이루어진 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)의 경우, 감염성 질병들에서만, 전 세계적으로 총 29종 이상(세균성 6종, 바이러스성 18종, 진균성 2종, 원생동물성 3종)이 보고되고 있으며, 이중 국내에 그 존재가 확인된 것은 총 15종(세균성 2종, 바이러스성 9종, 진균성 2종, 원생동물성 2종)으로, 이들에 대한 질병검사법이 주로 유전자검사법을 중심으로 개발되어 왔다.

이들 15종은 *Paenibacillus larvae* (AFB; 미국부저병), *Melissococcus plutonius* (EFB; 유럽부저병), *Ascospaera apis* (CB; 백목병), *Aspergillus fulavus* (SB; 석고병), *Nosema apis* (노제마병), *Nosema cerana* ((노제마병), Acute Bee paralysis virus (ABPV; 급성마비병), Black Queen Cell Virus (BQCV; 흑색여왕증), Chronic bee paralysis virus (CBPV; 만성마비병), Deformed Wing virus (DWV; 변형날개증), Israel acute paralysis Virus (IAPV; 이스라엘 마비병), Kashmir Bee Paralysis Virus (KBV; 캐시미어 봉증), Kakugo Virus (KV; 미친벌증), Sacbrood virus (SBV; 낭충봉아병), korean Sac Brood Virus (kSBV 한국형 낭충봉아병) 등이며, 여기에는 외부 꿀벌의 외부기생충(예; *Vorroa destructor*)등이 제외된 것이다.

이들에 대한 유전자검사법은 PCR법, 실시간 PCR법(Real-Time PCR), 초고속 PCR법(Ultra-Rapid PCR), 등온PCR법 (Isothermal PCR; LAMP) 등이며, 상기 국내 발견된 병원체 전부에 대하여, 또는 일부에 대하여 개발이 되어왔고, 또한 일부 병원체에 대하여는, 민감도는 떨어지나, 현장성에서 큰 장점을 가지고 있는 면역학적 방법(예; Immunochromatography)들도 개발되고 있다.

현재, 체계화가 시급한 뒤영벌류의 질병진단을 위하여, 가장 현실적인 방법은, 총체적인 실시간 PCR법(Real-Time PCR)의 확립이라 판단되며, 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)의 병원체 진단에서 가장 효과를 보여준 Primer 쌍들은 아래와 같이 정리되고 있다(표 1).

먼저, 각 primer쌍과 표준 검체 (Standard DNA sequences)를 이용한 대단위 PCR system을 확립하고, 이들을 뒤영벌류의 검체에 오염시켜 특이유전자 검사법이 뒤영벌에서도 유용함을 확인하고자 하며,

아울러, 뒤영벌의 검체들을 가급적 각 지역적으로 다양한 검체를 수집하고자 하며(성체사체 100여건, larvae 100여건 목표), 이를 향후 실험을 위하여 안정적으로 확보한 후, 확립된 PCR system을 적용하여, 뒤영벌류 유래 꿀벌 병원체의 존재여부를 각기 확인하고자 하였다.

이 결과를 바탕으로 뒤영벌의 검사에도 유용한 각 병원체의 검사법은 특이 primer쌍을 기반으로 확정될 것으로 기대하며, 상기의 검사결과에서 의양성 수준인 경우, 병원체의 변형을 고려하여, 뒤영벌 유래 병원체의 특이 염기서열의 확보를 위하여 다수의 Molecular cloning을 수행하고자 하였다.

표 1. PCR detection용 primer쌍들 (일반 PCR용, 정량 및 초고속 PCR용)

질병명 (유전자명)	primer명	primer서열 (5'→3')	PCR 산물 (bp)	균주명/PCR종류/문헌
미국부저병 (16S)	AFB16sNF	GTGTTTCCTTCGGGAGACG	233	<i>Paenibacillus larvae</i> /PCR
	AFB16sNR	CTCTAGGTCGGCTACGCATC		
미국부저병 (Mtp)	AFB MtpF3	ACTCACGGAGCTACAGAACA	229	<i>Paenibacillus larvae</i> /PCR/Phu et al., 2011. JA26(3)
	AFB1MtpB3	CCGAAGGTCCTTTGTAACGA		
미국부저병 (16S)	AFB 16SNF	GTGTTTCCTTCGGGAGACG	233	<i>Paenibacillus larvae</i> /UR-PCR/Han et al., 2008. JIP
	AFB 16SNR	CTCTAGGTCGGCTACGCATC		
유럽부저병 (16S)	EFB-NSF	AAGAGTAACTGTTTTCTCG	564	<i>Melissococcus plutonius</i> /(RT-)PCR/H a et al., 2006.
	EFB-NSR	ACGCCTTAGAGATAAGGTTT		
유럽부저병 (gyrase)	EFB-gyrF3	CGCCCAATTGTTGAAGCT	229	<i>Melissococcus plutonius</i> / PCR/ Phu et al., 2012.
	EFB-gyrB3	CGTCTCCACAATTGATGA		
백목병 (18S)	Asco18S-F	GGCTGTAGGGGGAACCAGGA	994	<i>Ascospaera apis</i> /PCR
	Asco18S-R1	CGGGTGGTCGTTCCAGCCTC		
백목병 (18S)	Asco18S-F	GGCTGTAGGGGGAACCAGGA	701	<i>Ascospaera apis</i> /PCR
	Asco18S-R2	CCTCAAACCTCCATCGGCTT AAGAA		
백목병 (18S)	QP-Asco F	TTAGAGGGACTATCGGTTCT	148	<i>Ascospaera apis</i> /RT-PCR
	QP-Asco R	TAACAAGATTACCCAGACCT		
백목병 (18S)	<i>A.apis</i> -F3	GCCGATGGAAGTTTGAGGC	228	<i>Ascospaera apis</i> /UR- PCR/Lee at al., 2011
	<i>A.apis</i> -B3	ACAAGCTGATGACTTGCGC		
식고병 (18S)	Asp 18S-F	ATCGGGCGGTGTTTCTATG	312	<i>Aspergillus fulavus</i> /PCR
	Asp 18S-R	ACCGGGCTATTTAAGGGCCG		

			코드번호	D-03
석고병 (18S)	Fungi 18S UF	CGCGCAAATTACCCAAT	1210	<i>Aspergillus fulavus</i> /PCR
	Fungi 18S UR	GGCGGTGTGTACAAAGG		
노제마병	Nosema-F	CTGCCTGACGTAGACGCTAT	592	<i>Nosema apis</i> /PCR
	Nosema-R	CTTCGATCCTCTAGCTTACG		
노제마병	Nosema-F3	CTACGTTAAAGTGTAGATA AGATGT	212	<i>Nosema cerana</i> /PCR/Lee <i>et al.</i> , 2010
	Nosema-B3	TCCATAACTGCCTCAGAT		
노제마병	Nosema180-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	180	<i>Nosema cerana</i> /UR-PCR/Yoo <i>et al.</i> , 2008
	Nosema180-R	AGCTTTCGCTTCTGTTCGTC		
<i>Nosema cerana</i>	Nosema230-F	ATTGGAGGGCAAATCAAGTG	212	<i>Nosema cerana</i> /UR-PCR/Yoo <i>et al.</i> , 2011.
	Nosema230-R	CTTCGATCCTCCAGCTTACG		
ABPV	ABPV-PF	TTATGTGTCCAGAGACTGTA TCCA	901	Acute Bee paralysis virus/ PCR
	ABPV-PR	GCTCCTATTGCTCGGTTTTT CGGT		
BQCV	BQCV-F	TGGTCAGCTCCCACTACCTT AAAC	700	Black Queen Cell Virus
	BQCV-R	GCAACAAGAAGAAACGTAAA CCAC		
BQCV	BQCV-RTF	TCGCAGAGTTCCAAATACCG	159	Black Queen Cell Virus/UR-PCR/Yoo <i>et al.</i> , 2011
	BQCV-RTR	TATCATCTCCCGCACCTACC		
BQCV	BQCV-Q-F	ATAGCCACTTCACCTCCTTCC	59	Black Queen Cell Virus/UR-PCR/Yoo <i>et al.</i> , 2011
	BQCV-Q-R	ATATCATCTCCCGCACCTACC		
CBPV	CBPV-F	AGTTGTCATGGTTAACAGGAT ACGAG	455	Chronic bee paralysis virus
	CBPV-R	TCTAATCTTAGCACGAAAGCC GAG		

			코드번호	D-03
CBPV	CBPV-F3	CATCAAACGGGAGTCCGG	228	Chronic bee paralysis virus/No <i>et. al.</i> , 2010
	CBPV-B3	ATCAAGGCGTACTTGCGG		
DWV	DWV-F	TCATCTTCAAACCTCGGCTTTC TACG	479	Deformed Wing virus
	DWV-R	CGAATCATTTCACGGGACG		
DWV	Q-DWV-F	TCATCTTCAAACCTCGGCTTTC	121	Deformed Wing virus/ UR-PCR/Lim <i>et al.</i> , 2013
	Q-DWV-R1	CAGTCAACGGAGCATAACAA		
DWV	Q-DWV-F	TCATCTTCAAACCTCGGCTTTC	262	Deformed Wing virus/ UR-PCR/Lim <i>et al.</i> , 2013
	DWV-Q-R2	CACACACTTCACCACAAGGA		
DWV	Q-DWV-F2	TTCAAACCTCGGCTTCTACGG	194	Deformed Wing virus/ UR-PCR/Lim <i>et al.</i> , 2013
	Q-DWV-R3	TCGACAACCTTTCGGACATCA		
DWV	Q-DWV-SF	TGTCCGAAAGTTGTCGAAAG AA	72	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim <i>et al.</i> , 2013
	Q-DWV-SR	CACCACAAGGAACAGATAAA TTAATCAA		
DWV	DWV-UR-F	TGTCCGAAAGTTGTCGAAAG AA	71	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim <i>et al.</i> , 2013
	DWV-UR-R	CACCACAAGGAACAGATAAA TTAATCAA		
DWV	DWV-UR-F3	GTTGTTTGAGAACCCAACCTTG	133	Deformed Wing virus/ UR-PCR/ Lim <i>et al.</i> , 2013
	DWV-UR-R3	CGCTTGCAACCACACTTTCA		
IAPV	IAPV-VP2-F3	GTTATAGGATTACCGTGGTGA	237	Israel acute paralysis Virus/PCR/No <i>et al.</i> , 2011
	IAPV-VP2-B3	GAACACGTATTGTAACCTTCTGT		
IAPV	IAPV-162PF	AACGACCCGAACAAAAACAC	162	Israel acute paralysis Virus/UR-PCR/Kim <i>et al.</i> , 2008
	IAPV-162PR	CGCAGGCATCATAACAACCT		

			코드번호	D-03
IAPV	IAPV-URR T203F	ACAATATGCAAAGGATCACC	203	Israel acute paralysis Virus/UR-PCR/Unpub lished
	IAPV-URR T203R	CATCCAACCTCCCAGAATTTA		
KBV	KBV-F	GATGAACGTCGACCTATTGA	415	Kashmir Bee Virus
	KBV-R	TGTGGGTGGCTATGAGTCA		
KBV	KBV-F	GATGAACGTCGACCTATTGA	441	Kashmir Bee Virus
	KBV-R"	CAGTTAAGGGGTGTTGTGTC		
KV	KV-F3(2)	TTAACGCTGAGCATGGTA	270	Kakugo Virus/PCR/Lee et al., 2012
	KV-B3(2)	ACTCGCTTCATTTCTGCTCTT		
SBV	SBV-F	ACCAACCGATTCCTCAGTAG	258	Sacbrood virus
	SBV-R2	TCTTCGTCCACTCTCATCAC		
SBV/kSB V/cSBV	SBV-FV	GGTGTATATGCGAGGAGG	318bp SBV	
	SBV-RV	GCAGTTTCATCTTCATCTTC	267bp kSBV 279bp cSBV	
SBV	SBV-F3	CGCGAATGATGTCATCTGT	225	Sacbrood vitus/PCR/Lee et al., 2011.
	SBV-B3	ATCTTCCAACCTGCACCAC		
SBV	SBV3-824-F 3	ATCCAGCGCGTCTTGAGT	136	Sacbrood vitus/ PCR/ Yoo et al., 2012.
	SBV-Semi- 136R	GAATCAAGGGGTGGGTGTTC		

(2) 뒤영벌 특이 변형 병원체에 대한 탐색

앞의 연구결과, 의양성/의음성으로 판정되는 검체에 대하여, Nested PCR을 기반으로 한 특이 유전자 증폭을 수행하며, 생산된 PCR산물에 대하여 direct sequencing을 통한 유전자 염기서열 결정을 시행한다. 이 염기서열의 결과로써 변형/고유 병원체의 존재를 판별할 수 있을 것으로 기대하며, 발견된 것들을 대상으로, 해당 유전체를 유전자 재조합법으로 확보하며, 이에 대한 새로운 유전자 검사기법을 개발하고자 한다.

(3) 뒤영벌 특이 병원체에 대한 PCR 탐색 시스템의 확립

상기의 연구결과 확립된 뒤영벌류에 대한 유전자 검사기법을 통합하여 일괄 PCR검사체계를 확립하며, 배양이 가능한 병원체에 대하여 배양검사를 통하여 정량적 기법도 확립한다.

일괄 PCR검사체계에 따라 얻어질 수 있는 검사결과는, 1) 각 검체(뒤영벌 1수 또는 2-3수)에 대한 국내 꿀벌에서 발견된 15종의 병원체의 존재 여부, 2) 존재하는 병원체의 정량치 (병원체수/뒤영벌 1수, 또는 병원체수/mg 뒤영벌), 3) 존재하는 병원체의 유전자 타입 등이 될 것이다.

(4) 뒤영벌 특이 병원체들을 발굴 및 이에 대한 특이 검사기법의 개발

뒤영벌은 뒤영벌 특이의 병원체들이 존재할 수 있음이 보고된 바 있다(김원태 등,2008). 이 보고는 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에서 *Bacillus fusiformis*와 *Klebsiella oxytoca*을 병원균으로 제시하였고, 호박벌(*B. ignitus*)에서는 *Pantoea dispersa*와 *K. oxytoca*를 또한 병원균으로 제시한 바 있다. 이 4개 세균은 꿀벌에서 병원체로 보고된 바 없으며, 본 과제에서는 이의 결과를 뒤영벌에서 확인하고 또한 병원균으로써 기능여부를 정량 PCR기법을 기반으로 정량적 확인을 하고자 한다.

(6) 수출입 검역기준의 법적 제도적 정비 및 신규 제정 노력

사실, 뒤영벌류의 수출입에 관한 검역기준은 본 과제의 연구에 의하여 쉽게 이루어질 수 있는 성질의 것은 아니다. 그러나, 농림축산검역본부 고시 제 2013-103호(2013.3.13). “금지품에서 제외되는 해충 결정을 위한 위험분석 및 수입검역요령”의 제6조(수입검역신청)에서, “① 금지품에서 제외되는 해충을 수입하고자 하는 자는 수입지를 관할하는 농림축산검역본부 지역본부장 및 사무소장에게 식물방역법시행규칙 별지 제4호 서식에 의한 수입신고 및 검역신청서와 수출국의 공공기관에서 발행한 동·식물위생증명서(Veterinary /Phytosanitary Certificate) 또는 식물확인증(Certificate of purity/ identity)(연구용의 경우 수출국의 생산자가 발행한 식물확인증 또는 해당 해충으로 실험하거나 사육하였음을 증명할 수 있는 연구 논문으로 대신할 수 있다)를 제출하여야 한다.”라고 하였으며, 이를 원용하는 방안을 크게 고려하고 있으며, 다른 한편, 농림축산검역본부의 꿀벌질병관리센터(소장; 조윤상 연구관)와 공동연구를 추진하는 방안 등을 고려하고 있다.

한편, 국내 뒤영벌류에 관한 대부분의 연구들은 농촌진흥청의 윤희주박사팀이 오랜 기간 동안, 여러 측면의 뒤영벌연구에서 크게 기여하여 왔음은 주지의 사실일 것이다. 이에 본 과제의 또 다른 목표인, 우수 여왕벌 계통의 육성, 청정생산기술 개발의 면에서, 이 연구의 주역을 맡아왔던 농촌진흥청의 도움을 크게 기대하고 있으며, 아울러 윤희주박사팀과의 연구협조 또는 공동연구를 또한 기대하고 있다.

○ 청정 생산기술 개발 및 수출용 우량 서양뒤영벌의 청정육성

□ 연구목표

청정 생산기술 개발 및 수출용 우량 계통 서양뒤영벌 청정 육성

□ 연구내용

- 육종용(일벌 다발) 및 증식용(일벌 다발) 여왕벌 계통의 육성
- 인공수정에 위한 우수 계통 뒤영벌 여왕벌 품종 유지 및 계대배양 및 확보
 - 우수 서양뒤영벌의 예상 공급처: 농촌진흥청, 협동기업, 선진제국의 제품으로 수입 등
 - 인공수정조건. 성충조건: 여왕벌 우화 5-10일, 수벌 7-14일;
 - 탄산가스 주입량: 50ml/min/20℃; 정자량: 2ul
 - 인공수정률, 봉세발달 등
- 액상 설탕물 개발
- 청정 생산 기술의 개발(무병원균 무충)
 - 간이 청정 생산 설비의 설치(적정 설치기준 시험; 음압설비의 기준 시험 등)
 - 생체 서양뒤영벌에 대한 소독법의 개발 (seed disinfection)
 - 생산설비에 대한 적정 소독법의 개발
 - 각 생산 단계에서 병원체 유입 및 감염, 전파 수준에 대한 병원체 검사 및 유효성 판정
 - 청정시설로 유입되는 각 소비재(설탕, 화분 등)의 검사 시스템 확립
(qPCR, Immunochromatography법)
 - 확립된 정성/정량 실험법에 따른 뒤영벌의 보건위생 관리 및 제어
 - 설비내 인공감염에 의한 검색/검량 기준의 책정 및 소독법 처리후 검색/검량
 - 원격 모니터링에 의한 뒤영벌 생산과정 중 실시간 이상 징후 예찰 방법 (온도, 습도)

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절 국내 화분매개 곤충 이용현황

<본 절 내용의 상당 부분은 *Journal of Apiculture* 32(3): 223-235에서 Yoon et al. (2017)에 의해 Survey of insect pollinators use for horticultural crops in Korea, 2016의 제목의 논문으로 발표된 것을 재인용한 것임>

1. 국내 화분매개 곤충의 사용 비율 및 규모

국내의 경우, 자연적 수분을 기대할 수 없는 시설재배는 그 면적이 계속 증가되고 있으며, 또한 일부 야외 생산 과수의 경우, 야생의 화분매개곤충에 의한 수분활동이 충분치 않은 것으로 파악되고 있다(Yoon et al., 2017).

국내 26개 채소에 대하여 2016년에 조사된 결과는, 총 관련 농가 중 25.8% (55,208농가)가 화분매개 곤충을 수분용으로 사용하였으며, 사용된 화분매개 곤충의 총 봉군수는 479,777군으로 집계되었다(Yoon et al., 2017).

사용된 화분매개곤충(총 479,777 봉군)을 곤충별로 살펴보면, 꿀벌(*Apis mellifera*)이 344,690 봉군, 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)이 119,104 봉군, 빨가위벌류(masen bee)가 12,051봉군, 파리류(fly)가 1,317봉군으로 집계되었다(Yoon et al., 2017).

국내에서 화분매개 곤충이 주로 사용되는 주요 채소 작물은 11종으로 파악되었으며, 수박, 딸기, 참외, 토마토, 고추, 멜론, 채종용 양파, 호박, 오이, 여주 등이었다. 이들의 총 재배면적은 45,194 ha로 집계되었으며, 이중 화분매개곤충을 사용하는 재배면적은 26.896 ha로 총 재배면적 중 59.4%이 이르렀다(2016). 이는 2011년에 수행된 같은 연구에서 화분매개 곤충을 이용한 재배면적이 48.4%이었던 것이 비하여 10%이상 화분매개곤충을 사용하는 재배면적이 증가한 것으로 파악된다 (Yoon et al., 2017).

특히, 2011년 조사에서 수박 및 토마토의 재배는 총 해당 작물의 재배면적 중 45.8% 및 40.4%만이 화분매개 곤충을 사용한 것으로 집계되었으나, 2016년의 조사에서, 각기 64.8%

및 63.6%를 차지하는 것으로 나타나, 각기 약 20% point가 5년사이에 증가됨을 보였다 (Yoon et al., 2017).

상기 11개 채소 작물의 재배에 사용된 화분매개 곤충의 총 봉군수는 449,287이었으며, 곤충 별로는 꿀벌이 72.3%의 봉군수를 차지하며, 뒤영벌이 25.1%, 꿀벌과 뒤영벌의 혼합 사용이, 별도로, 2.4%, 양과재배에 한하여 사용되고 있는 파리가 0.2%로 나타났다(Yoon et al., 2017).

2. 국내 화분매개 곤충의 사용 비율 및 규모의 변화(2011-2016)

11개 채소 작물에 대한 화분매개 곤충의 사용 규모는 2011년 조사(Yoon et al., 2013)와 2016년 조사(Yoon et al., 2017)에서 유의미한 증가세를 보이고 있으며, 총 화분매개 곤충의 봉군수는 전자가 306,856봉군이었으나, 후자는 449,287봉군으로 집계되어 약 1.5배의 증가세를 보였다.

특히, 뒤영벌의 경우 전자가 52,684봉군이었던 것에 비하여, 후자는 112,974봉군으로 집계되어, 연간 사용된 뒤영벌의 봉군수가 2배 이상 증가되어, 화분매개 곤충 중 가장 높은 증가율을 보였다. 또한 특기할 점은 딸기재배에서 뒤영벌의 사용량이 10배이상 증가되었다는 것이다(Yoon et al., 2013; 2017).

한편, 파리류는 채소 중 채종용 양과에서만, 그리고 과수 중 망고에서만, 이들 수분을 위하여 사용되고 있음이 새로이 확인되었다(Yoon et al., 2017).

3. 화분매개 곤충의 가격 및 수급 상황

화분매개 곤충 중 꿀벌의 구입가격은 평균 98,000원으로 집계되었으나, 9-15만원대가 54.9%로, 3-6만원대가 22.6%로 응답되어, 큰 편차를 보여주었다. 뒤영벌의 평균 구입가격은 61,000원으로 집계되었으며, 6-9만원대가 85.3%, 3-6만원대가 13.8%로 응답되어 역시 적지 않은 편차를 보여 주었다. 한편, 빨가위벌류의 평균 구입가격은 59,000원으로 집계되었으며, 6-9만원대가 77.8%, 3-6만원대가 22.2%로 응답되어 역시 적지 않은 편차를 보여 주었다(Yoon et

al., 2017).

구매가격의 큰 편차는, 꿀벌의 경우, 보다 큰 수익을 기대할 수 있는 유밀기의 봉군가격이 크게 오르는 등 계절별로 봉군의 가격이 많게는 3배까지 변화한다는 이유가 있으며, 타 화분매개 곤충과는 달리 임대하는 가격이 적용될 수 있기 때문으로 해석된다. 상대적으로 편차가 적은 편이나, 뒤영벌과 빨가위벌류의 경우는, 화분매개곤충 시장의 후발주자인 빨가위벌류의 판매가격이 선발주자인 뒤영벌의 그것에 비하여 안정되지 않은 것이 아닌가 사료된다.

4. 재배 면적 당 각 화분매개 곤충의 활용 상황

11개 채소 재배에서, 재배면적 3,000m²(1,000평) 당 각 화분매개 곤충의 평균 사용봉군수는, 꿀벌이 14.2 봉군으로, 뒤영벌은 15.4 봉군으로 조사되었다(Yoon *et al.*, 2017).

한편, 15개 과수(사과, 감, 배, 망고, 산딸기, 블루베리, 봉숭아, 참다래, 패션프루트, 여주, 대추 등)의 재배면적 3,000m²(1,000평) 당 각 화분매개 곤충의 평균 사용봉군수는, 꿀벌이 14.2 봉군으로, 뒤영벌은 15.4 봉군으로 조사되었다(Yoon *et al.*, 2017).

4. 화분매개 곤충에 대한 사용자(농민)의 평가

화분매개 곤충을 사용한 1,120농가를 대상으로, 화분매개 곤충의 사용시 만족도를 조사한 결과, 향후 사용확대의 의견이 39.4%, 현행유지의 의견이 57.6%이었으며, 축소하겠다는 의견은 단 3.0%로 나타났다. 이는 국내에서 화분매개곤충의 시장성이 더욱 확대될 것으로 예측하는 근거이다(Yoon *et al.*, 2017).

제 2 절 국내 꿀벌 질병 진단제의 시장 진입

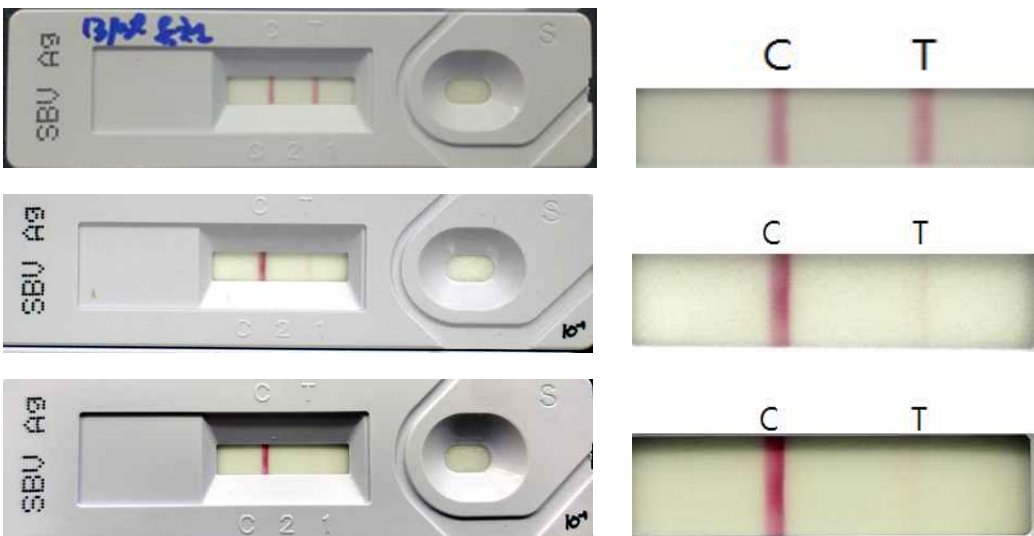
1. 낭충봉아부패병 바이러스 진단용 면역크로마토그래피 제품 제조 허가 신청

한국형 낭충봉아부패병 바이러스(kSBV; korean Sacbrood Virus)는 2011년 이래 국내 토종 벌에 큰 타격을 입힌 병원성 바이러스이다.

(주)바이오노트는 면역크로마토그래피법(Immunochromatography; IC)을 기반으로 하여 다양한 병원체들을 검사할 수 있는 키트를 개발, 생산, 판매하고 있는 회사로써, 상기의 kSBV를 포함하는 모든 SBV를 검출할 수 있는 IC kit를 개발하였고, 2017. 12월 제조/판매허가를 신청하였다.

신청된 낭충봉아부패병 항원 진단키트는 바이오노트사의 Antigen Rapid SBV Ag test Kit (Lot No.: T20170616)이며, 이 Kit는 꿀벌의 유충 검체에서 낭충봉아부패병 바이러스 항원을 검사하는 면역학적 체외 진단용 키트이다.

검사 결과, 양성, 의양성, 음성의 예는 아래와 같으며, 유충의 시료를 작은 비닐백에 넣고, 이를 완충액과 함께 손가락으로 으깨어, 추출액을 시료액 투입구에 넣는 것으로 검사과정을 간략화 하였다.



ONE STEP 남충봉아부패병 항원 진단

동물용 의료기기 (연구용)

바이오노트 래피드 남충봉아부패병 항원 진단키트

■ 설명

Antigen Rapid SBV Ag Test Kit

■ 개요

본 제품은 고품질의 유충 검체에서의 남충봉아부패병 바이러스 항원을 검사하는 체외진단용 키트입니다. 나이트로셀룰로스 멤브레인을 solid phase로 하여 검사선 위치에 마우스 단클론 남충봉아부패병 바이러스 항체를 흡착시킨 후, 검액(검체를 검체 희석액으로 희석한 것)을 적하하면 검체 중에 존재하는 남충봉아부패병 바이러스 항원이 1차적으로 글드 패드에 결합되어 있는 마우스 단클론 남충봉아부패병 바이러스 항체와 반응하여 immunochromatography 원리에 의해 멤브레인을 따라 이동하면서 이미 검사선 위치에 고정되어 있는 마우스 단클론 남충봉아부패병 바이러스 항체의 2차적으로 반응하면서 항체-항원-항체 복합체를 형성하여 direct-sandwich 원리에 의해 양성일 경우 보라색으로 발색하게 됩니다.

■ 제품 구성표

명칭	세부 구성	외관상 특징
검사용 디바이스	<ul style="list-style-type: none"> 검사선, 대조선이 코팅된 나이트로셀룰로스 멤브레인 항체 결합 글드 클로이드에 분주되어 건조된 본뉴게이트 패드 검체패드 흡수패드 	<p>플라스틱 카세트 외부에 SBV Ag로 표시가 되어 있고, 하원형의 검체 적정 부위(S)가 있고, 직사각형의 표시창에는 대조선(C)과 검사선(T) 위치가 표시되어 있으며, 내부의 검체 사용 스트립에는 각각에 검체 패드, 보라색의 본뉴게이트 패드, 백색 나이트로셀룰로스 멤브레인, 흡수패드가 차례대로 중첩하여 부착되어 있습니다.</p>
검체 희석액	단일	스크류캡 튜브에 담긴 무색 용액
소형 지퍼백	단일	비닐 재질의 투명한 지퍼백
검액 점적용 1회용 드롭퍼	단일	스모이드 형상의 반투명한 플라스틱 체계

■ 원재료 또는 성분 및 분량

명칭	배합목적	원재료 또는 성분	분량
검사용 디바이스			
· 나이트로셀룰로스 멤브레인	주성분	검사선 : 단클론 남충봉아부패병 바이러스 항체	0.6 ± 0.15µg
	주성분	대조선 : 단클론 항 닭 항체	0.6 ± 0.15µg
· 본뉴게이트 패드	주성분	단클론 남충봉아부패병 바이러스 항체 결합글드 클로이드 - (OD 10:540nm), 닭 항체 (chicken IgY)	0.058 ± 0.0145g 0.033 ± 0.008g
	주성분	검체패드	
· 검체패드	보조성분	종이 패드	
· 흡수패드	보조성분	종이 패드	
· 플라스틱 카세트	지지대		
	흡수재		
방습제(실리카겔)	완충액	50mM 트리스-염산완충액(pH8.0)	1 ml
	보조성분	Triton X-100	0.1%
검체 희석액	보조제	아지트화 나트륨	0.02%
	보조기구		
소형 지퍼백	보조기구		
검액 점적용 1회용 드롭퍼	보조기구		

■ 사용 목적

면역크로마토그래피 원리를 이용하여 고품질의 유충 검체에서의 남충봉아부패병 바이러스 항원을 정성적으로 검사하는 보조진단키트

■ 사용 방법

1. 검체준비 및 저장방법
 고품질의 유충을 검체로 사용합니다.
 2. 검사 전 준비사항
 1) 검사용 디바이스는 습기에 민감하므로 시험 시작 직전에 호일파우치에서 꺼냅니다.
 2) 검체 개수만큼의 검사용 디바이스와 B/N tube (검체 희석액), 소형 지퍼백, 검액 점적용 1회용 드롭퍼를 준비합니다.
 - 3) 검사용 디바이스의 검사창은 손으로 만지지 않습니다.
 - 4) 검사용 디바이스가 포함되어있는 호일 파우치가 손상되었을 경우 사용하지 않습니다.
 - 5) 키트의 구성물을 다른 제품과 혼용하여 사용하지 않습니다.
3. 검사과정
 1) 검체 희석액 튜브에 담긴 버퍼를 소형 지퍼백 안에 붓습니다.
 2) 소형 지퍼백 안에 유충을 넣고 밀봉하여, 손으로 유충을 으깁니다.
 3) 검액 점적용 1회용 드롭퍼를 이용하여 지퍼백 속 액체를 채취합니다.
 4) 키트의 샘플 홀에 4방울(120µl) 점적합니다.
 5) 15분 후에 결과를 판독합니다.

[검사 방법 요약표]



4. 결과 판독

① 음성 : 대조선(C) 위치에 한 밴드만 나타나는 경우



② 양성 : 대조선(C)과 검사선(T) 위치에 두 밴드가 나타나는 경우



③ 재시험 : 어떠한 밴드도 나타나지 않는 경우 혹은 검사선에만 밴드가 나온 경우



5. 결과의 해석

- 1) 양성 : 본 제품의 검사 결과가 양성인 경우 남충봉아부패병 바이러스 항원이 존재하는 것으로 판단할 수 있습니다. 그러나 양성결과를 나타내더라도 백신바이러스 및 기타의 강독형 바이러스를 감별할 수는 없습니다. 본 제품은 1차 검사용으로 사용하여야 하며, 양성 판정된 검체는 재검하여 재검 결과를 확인하고, 이 검사의 결과와 함께 다른 임상 결과나 실험 결과를 함께 이용하여 남충봉아부패병 전문 진단기관에 의뢰하여 최종 진단을 내려야 합니다.
- 2) 음성 : 검체 내 바이러스 역가가 낮은 경우 음성으로 판정될 수 있으므로, 검사결과가 음성인 경우에도 남충봉아부패병 바이러스 항원이 존재하지 않는 것으로 확정할 수는 없습니다.
6. 정도 관리
 1) 모든 검사 결과는 대조선(C)에 보라색 선이 나타나야 합니다.
 2) 대조선에 밴드가 나타나지 않으면 검사가 잘못된 경우 또는 시약의 통장에 문제가 있을 가능성이 있으므로 이 검사는 무효화시키고, 새로운 시약으로 재시험 합니다.
 3) 대조선에 밴드가 나타나지 않는 경우는 검체량 부족 등의 조작상의 미숙일 수 있으므로 재시험 합니다.

■ 사용 시 주의사항

- 1) 동물용 체외진단용으로만 사용합니다.
- 2) 반드시 각 검체마다 별개의 검체 희석액, 소형 지퍼백, 검액 점적용 1회용 드롭퍼를 사용합니다.
- 3) 검액 점적 시 수직으로 점적합니다.
- 4) 유효 기간이 경과한 시약은 사용하지 않습니다.
- 5) 검체는 미지의 바이러스나 세균 감염원으로서의 위험성을 내포하고 있으므로 취급에 주의하며, 검액 가능한 물질의 취급 시에는 일회용 장갑을 사용하고 취급 후 손을 깨끗이 씻습니다.
- 6) 실험에 사용한 고형 폐기물을 121℃에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기합니다.
- 7) 본 제품은 남충봉아부패병 바이러스 항원 검출에 관한 1차적인 스크리닝 목적으로 고안된 진단시약으로서 간편하고 신속한 방법으로 결과를 얻을 수 있으나, 보다 정밀하게 고안된 원리의 검사법과 검출 감도면에서 차이를 보일 수 있습니다.
- 8) 키트로 양성반응이 확인된 경우에만 남충봉아부패병 바이러스 양성으로 판단할 수 있으나, 바이러스 배양량이 낮은 경우 음성반응이 확인된다 하더라도 바이러스 음성으로 확정할 수 없습니다. 따라서, 남충봉아부패병 전문 진단기관에 의뢰하여 최종진단을 받아야 합니다.
- 9) 본 제품은 여러 가지 요인으로 위양성, 위음성 결과의 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 본 제품의 결과만을 기초로 최종 진단할 수 없습니다.
- 10) 반드시 전문 수의사가 사용해야 하며, 본 제품의 결과 및 다른 검사결과와 임상소견에 근거하여 최종 진단을 내려야 합니다.

■ 포장 단위

원료약품	포장단위	IO Tests/Kit
검사용 디바이스		1 device/포 x 10포
검체 희석액		1ml/병 x 10병

■ 저장 방법 및 사용기간

구성시약	개봉여부	보관조건	유효기간	비고
검사용 디바이스	미개봉	온도2~30℃, 밀봉	24개월	완제품
	개봉	보관 안됨	-	즉시사용
검체 희석액	미개봉	온도2~30℃, 밀봉	24개월	완제품
	개봉	보관 안됨	-	즉시사용

※ 검사키트는 냉동보관하지 않도록 주의.

문서번호 : Rev.1(R)
 작성일자 : 2017. 03. 02

ONE STEP 낭충봉아부패병 항원 진단

구성품

검사용 디바이스	검체 회석액	소형 지퍼백	검액 점적용 1회용 드롭퍼	인서트
				

사용 방법

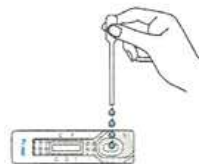
① 검체 회석액 튜브에 담긴 버퍼를 소형 지퍼백 안에 붓습니다.

② 소형 지퍼백 안에 유충을 넣고 밀봉하여, 손으로 유충을 으깬니다.



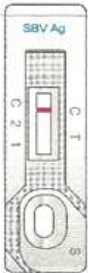
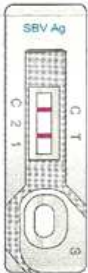
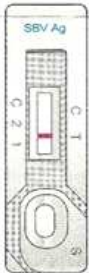
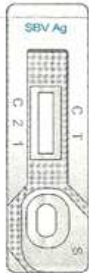
③ 검액 점적용 1회용 드롭퍼를 이용하여 지퍼백 속 액체를 채취합니다.

④ 키트의 샘플 홈에 4방울(120 μ l) 점적합니다. 15분 후에 결과를 판독합니다.



15분 후 판독

결과 해석

음성	양성	재검사
		
		

2. 뒤영벌 병원성 바이러스 진단용 면역크로마토그래피 제품의 개발

낭충봉아부패병 바이러스(SBV)와 같이, 뒤영벌에 대한 병원체들은 많은 경우, 꿀벌의 병원체와 유사성이 높으며, 사실 꿀벌에서 발견된 많은 병원체들이 뒤영벌에서도 발견되고 있다.

따라서, 면역크로마토그래피(IC)법에 의한 꿀벌병원체의 진단키트들은 대부분 뒤영벌 병원체의 검사에 사용될 수 있는 것으로, 현재 (주)바이오노트사, (주)메디안 등이 개발하고 있는 IC법 기반의 미국부저병 진단키트, 유럽부저병 진단키트, 꿀벌 바이러스 진단키트들은 조만간 시장에 진출할 것으로 기대하며, 이들이 양봉인의 손에 주어질 때 우리의 방역체계는 보다 실제적이 될 것으로 기대한다.

제 3 절 국외 새로운 유전자 진단방법으로 RPA의 대두

1. Twist사 RPA기반 진단제의 진단 영역확대

Twist사는 영국에 본사가 있으며, 근래 RPA(Recombinase-polymerase Amplification)법을 기반으로 한 특이 유전자 증폭법의 다양한 키트들을 출시하고 있다.

이 회사의 제품은 원래 RPA를 기반으로 특이 유전자를 증폭하고, 이를 형광으로 인식하게 하는 방법을 주로 보여주었으나, 근래 RPA에 lateral flow detection을 결합시켜, 약점으로 지적되었던 specificity를 보다 높이는 방법들을 출시하고 있다.

RPA의 원리에 대하여 Twist사는 “How does RPA work? The RPA reaction exploits enzymes known as recombinases, which form complexes with oligonucleotide primers and pair the primers with their homologous sequences in duplex DNA. A single-stranded DNA binding (SSB) protein binds to the displaced DNA strand and stabilizes the resulting D loop. DNA amplification by polymerase is then initiated from the primer, but only if the target sequence is present. Once initiated, the amplification reaction progresses rapidly, so that starting with just a few target copies of DNA, the highly specific DNA amplification reaches detectable levels within minutes.”라 설명하고 있다.

RPA의 장점에 대하여, “**Why recombinase polymerase amplification?**”의 제목으로 아래와 같이 다각도로 나누어 광고하고 있다. 이의 전문을 소개하면 아래와 같다.

가. Speed. RPA is fast, and at typical optimum reaction temperatures of 37-42°C just a few nucleic acid molecules can be amplified to detectable levels (typically) in 3-10 minutes, although this will depend on target size. In many cases, one person, with no specialist training, would be able to take a sample, prepare it, run the assay and get results within half an hour. Compare this with the 24-hour turnaround times that are currently typical for clinical samples that must be sent off for processing at central laboratories.

나. Sensitivity. RPA can detect single copies of DNA and tens of copies or fewer of RNA in complex samples, without the need for prior nucleic acid purification.

다. Specificity. RPA is so specific that the technology can detect and amplify a single molecule of DNA that is present in a sample containing potentially hundreds of nanograms of unrelated, complex genomic DNA from multiple, diverse species, including human DNA.

라. Low temperature operation.

RPA operates at a constant, low temperature (optimally 37-42°C) and does not require initial melting of the sample DNA. For some applications the RPA reaction can even be supported by body heat, if necessary. The reaction is also robust at off temperatures and low temperature setups, and will even work, albeit more slowly, at the typically ambient temperature of 25°C. At this temperature results can still be obtained within an hour, as long as the biochemistry has been appropriately configured.

마. Sample tolerance.

RPA is very forgiving of sample type, and in some instances can work directly on complex samples, such as blood, nasal swabs or culture media, which have not gone through nucleic acid purification. Often, it may be enough to subject the sample to basic pathogen lysis methods, such as treatment with heat or a weak alkali, to release the nucleic acids. The most appropriate sample preparation method required for each assay will be dependent upon factors such as pathogen titre, presence of inhibitors and lysis requirements, and will need to be designed into the assay procedure. This robustness of RPA to some complex sample types make the technology very well suited, in principle, for potentially wide-ranging field-based and point-of-care applications.

바. Broad applicability.

RPA can be readily applied to any DNA or RNA target. End users have already reported

developing ultra-high sensitivity, one-pot RNA detection assays by adding reverse transcriptase to the reaction mix.

사. Multiplexing.

By combining multiple primers in the same reaction tube, a single RPA test can be used to amplify and detect several different targets.

아. Broad applicability.

RPA can be readily applied to any DNA or RNA target. End users have already reported developing ultra-high sensitivity, one-pot RNA detection assays by adding reverse transcriptase to the reaction mix.

자. Multiplexing.

By combining multiple primers in the same reaction tube, a single RPA test can be used to amplify and detect several different targets.

차. Low cost burden.

RPA requires only a basic detection device, which means that end users can use our products to develop user-friendly diagnostic assays and kits for a wide range of applications and settings.

카. Flexible reaction formats

The core reaction components are either provided in a stabilised, dried form for easy transportation and storage without refrigeration for up to 12 months (application-specific variation in stability is possible and long-term storage under refrigeration is still recommended) or in a liquid form more typical of PCR reagents, which provide the user with the capacity to vary reaction volume and component ratios for their specific applications.

타. Multiple detection formats

RPA can be applied to a wide range of detection systems and instrumentation, including fluorescence, real time probes and sandwich assay formats.

참고로 현재 Twist사에서 판매되고 있는 키트의 예와 판매가격을 기술하면 아래와 같다.

(1) TwistFlow® Salmonella.

Sample lysis and DNA amplification kit for lateral... £105.00

(2) TwistGlow® Salmonella.

Sample lysis and real-time fluorescent DNA... £299.00

(3) TwistAmp® nfo.

DNA amplification for lateral flow detection made possible... £240.00

(4) TwistAmp® exo +ListeriaM

Kit contains all enzymes, oligos and reagents necessary for... £299.00

한편, Twist사가 주장하는 적용분야는 본 보고서의 제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학 기술 정보에 수록한다.

2. 본 과제에서 Twist사 RPA기반 뒤영벌 병원체 진단키트의 개발 및 평가

본 과제는 Twist사의 제품을 사용하여 뒤영벌 병원체 검출용 RPA (Recombinase-polymerase Amplification)법을 개발하였으며, 이 과정에서 RPA법에 의한 유전자 증폭의 특성 및 장단점을 평가하였다(제 3 장, 제 9 절 및 제 10 절).

이 연구과정에서 RPA의 장단점을 일부 취득하였으며, 평가결과를 간단히 기술하며, RPA에 대한 기술이 보다 보강되어야 한다는 전제로, RPA법에 의한 검출은 그 특이성에 확신을 가질 정도의 변별력은 보여주지 못하였다 판단한다.

제 3 장. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

제 1 절 Slow Bee Paralysis Virus (SBPV) 신속 검출을 위한 초고속 역전사 중합효소 연쇄반응법의 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 32(3): 171-180 (2017)에 Development of ultra-rapid reverse-transcription PCR for the rapid detection against Slow Bee Paralysis virus (SBPV)의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에 대한 병원성 바이러스는 모두 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 병원체로 처음 알려진 것들이며, 국내에서도 Black queen cell virus (BQCV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Cloudy wing virus (CWV), Deformed wing virus (DWV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), Kashmir bee virus (KBV), Sacbrood virus (SBV)의 7종이 서양뒤영벌에서 검출된 바 있다(최 등, 2009; 최 등, 2010). 또한, *A. mellifera*와 *Bombus species*에서 개별적으로 Acute bee paralysis virus (ABPV), BQCV, DWV, Slow bee paralysis virus (SBPV)들이 병원체로 검출된 바 있으며, 특히 *Bombus species* 중 일부에서 SBPV의 발병률이 특히 높음이 보고된 바 있었다(Dino et al, 2015). 이들은 잠복기간이 길며, 효과적으로 알려진 예방 및 방제법이 없으며, 수시로 다른 감염체와 혼합감염 등으로 봉군에 위해를 가하는 것으로 알려져 왔다.

이들 바이러스 중 SBPV는 다른 꿀벌바이러스와 같이 *Iflaviridae family*에 속하며, 약 9.5kb 정도의 positive-strand RNA virus이다. SBPV는 영국에서 1974년에 별 바이러스 X와 관련된 연구 중 우연히 발견되었으며, SBPV에 감염된 성체는 사멸하기 하루 전후로 앞의 두 다리가 마비된다고 하여 SBPV라 명명되었다(Bailey and Woods, 1974).

SBPV 검출에 대한 연구는 뒤영벌의 다양한 병원체들에 대한 실시간 다중 PCR법(민 등, 2017)에서 처음 제시된 바 있었으나, 국내에서 SBPV에 감염된 뒤영벌을 발견하지 못하였고, SBPV의 검출을 위한 보다 신속하며, 현장 적용성이 가능한 방법은 개발된 바 없었다. 국내의 뒤영벌에서 이들의 감염 현황을 파악하는 것은, SBPV 검출의 보고도 없었기에, 유관된 자료조차 찾기 어려웠다.

따라서 본 연구는 서양뒤영벌의 병원체로 의심되는 SBPV의 보다 빠른 검출과 이 검출법의 보다 간편한 현장 활용을 위하여, SBPV 특이 초고속 PCR법을 새로이 개발하고자 하였으며, 이 SBPV 특이 초고속 PCR법을 이용하여 국내 뒤영벌에서 SBPV를 검출하고 현황을 파악하는데 기여하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 뒤영벌 시료 확보 및 total RNA의 추출

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 수원, 전라남도 보성, 경상북도 청송, 벨기에에서 구입된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 사용하였다.

Total RNA 분리는 RNAiso Plus Kit (Takara, Japan)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 약술하면, 날개를 제거한 뒤영벌 시료 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합한 후, 1.0ml RNAiso Plus 시약을 넣고 MagNa Lyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 200 μ l chloroform을 넣고 15초간 vortexing하여 혼합하였으며, 4°C에서 13,000rpm 10분간 원심분리하여, 상등액을 1.5ml tube에 옮겼다. 시료상등액과 같은 부피의 isopropyl alcohol을 넣고 15초간 vortexing하여 혼합하였으며, 4°C에서 13,000rpm, 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. RNA 침전물은 75% ethanol을 사용하여 washing 과정을 진행한 후, DEPC 처리된 증류수를 사용하여 total RNA의 용액으로 확보하였다. 추출된 total RNA는 Biophotometer (Eppendorf Co., Germany)를 사용하여 OD260 (Optical Density 260nm)으로 정량하였고 -70°C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

나. SBPV 특이 유전자의 재조합 DNA 제작 및 Primer 선별

SBPV 특이 유전자 재조합 DNA (pSBPV-329)는, 경기대학교 생명과학과 분자생물학 연구실에 확보된 것을 사용하였으며, 여러 SBPV primer 쌍 중 Ultra-rapid PCR에 최적인 primer를 선별하여 사용하였다. 유전자 정보 및 참고문헌은 Table 1과 Supplement Table S1에 나타내었다.

다. SBPV 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

초고속 PCR의 최적화를 위하여, 주형으로 재조합 DNA pSBPV-329를 사용하였으며,

OD260으로 정량한 후, 1.0×10^5 분자를 기준으로 초고속 PCR에 사용하였다. 초고속 PCR을 위한 Thermocycler는 GENECHECKER (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 95°C 초기 변성 15초 후, 95°C 변성 3초, 혼성 3초, 72°C 중합 3초를 기준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다. 최적 annealing 온도는 50-65°C 범위에서 구하였으며, 최적의 primer 농도는 10 μ M, 8 μ M, 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.25 μ M에서 각기 C_T (Threshold Cycles)값과 최대 형광값의 측정으로 조정하였다. 이후, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 상기의 기준조건부터 최적 혼성온도와 시간을 C_T 값과 최대 형광값을 기준으로 재조정하였다.

Table 1. Slow bee paralysis virus specific primers information

Name of primers	Sequence (5' → 3')	PCR amplicon size (bp)	Reference
SBPV F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224	민 등, 2017
SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA		

라. SBPV 특이 유전자의 최소 검출 시간에 따른 검출 한계 측정

SBPV 특이 초고속 PCR의 최소 검출 시간에서 특이 검출의 한계를 측정하기 위하여 초고속 PCR의 각 회전 중 변성, 혼성, 중합의 시간을 각각 3초에서 1초까지 감소시켜 각 온도와 시간 조건에 따른 C_T 값과 C_T 값이 측정되는 시간(C_T time)을 측정하였다. 이 측정에서는 재조합 DNA인 pSBPV-329를 1.0×10^8 분자부터 1.0×10^0 분자까지 연속 희석하여, 초고속 PCR의 주형으로 사용하였으며, 초고속 PCR의 각 단계에서 시간 및 온도 조건도 가감하여, SBPV 특이 초고속 PCR이 최소 검출 시간 내에 검출 가능한 최소 한계를 추구하였다.

마. 뒤영벌 gDNA 존재하에 SBPV 특이 초고속 PCR의 검출한계 및 정량 범위

뒤영벌 gDNA 존재하에 SBPV 검출한계를 측정하기 위하여, SBPV 에서 추출한 핵산을 주형으로 SBPV 특이 유전자의 증폭량을 확인하였다. PCR 반응은 5 μ l의 2 × Rapi master mix 와 1 μ l씩의 SBPV F/SBPV-C3G peptidase R (최종 농도 2 μ M) primer에 뒤영벌 gDNA (100ng)를 첨가하여 총 10 μ l로 조성하여 수행하였으며, 초고속 PCR의 각 단계에서 시간 및 온도 조건은 앞선 실험의 최적화한 조건에 근거하여, 95°C 초기 변성 15초 후, 95°C 변성 1초, 59°C 혼성 2초, 72°C 중합 1초를 표준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다.

바. 국내 뒤영벌에서 SBPV 특이 초고속 RT-PCR을 적용한 검출

국내에 판매되고 있는 서양뒤영벌의 SBPV 감염여부를 판단하기 위하여, 경기도 수원, 전라남도 보성, 경상북도 청송, 벨기에에서 생산된 뒤영벌 각 1마리에 대하여 Total RNA를 분리하였다. Total RNA는 각 100ng을 사용하여 뒤영벌에 대하여 SBPV 특이 초고속 역전사 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 5 μ l의 2 × Rapi RT master mix와 1 μ l씩의 SBPV F/SBPV-C3G peptidase R (최종 농도 2 μ M) primer로 총 10 μ l로 구성되어 수행하였다. SBPV 특이 초고속 역전사 PCR은 GENECHECKER (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, 최적화된 PCR의 온도 및 시간 조건은 50°C, 1분 역전사 반응 후, 95°C, 15초 초기 변성, 95°C, 1초 변성, 59°C, 2초 혼성, 72°C, 1초 중합을 1회전으로 하여 총 50 회전을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. SBPV 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

SBPV 특이 초고속 PCR에서 최적의 혼성 온도를 파악하고자 재조합 DNA 1.0 × 10⁵ 분자의 pSBPV-329를 사용하였으며, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 95°C 초기 변성 15초 후, 95°C 변성 3초, 50-65°C 혼성 3초, 72°C 중합 3초를 표준으로 총 50 회전 진행하였다.

SBPV 특이 유전자 초고속 검출가능의 온도는 53-65°C의 범위이며, 50°C의 경우, 정량적 검출이 어려워 최적조건 정립에서 제외하였다. 가장 빠른 C_T는 혼성 온도 59°C일 때 23.14 회전으로 측정되었으며, 이에 이르기까지 소요된 PCR 진행 시간(C_T time)은 8분 22초이었다. 따라서 SBPV 특이 초고속 PCR에서 최적 혼성 온도는 최저 C_T 값 및 C_T time, 그리고 최종 형광값(증폭량, F=262) 모두에서 우수한 결과를 보인 59°C로 결정하였다(자료 미제시).

또한, 초고속 PCR에서 SBPV 특이 primer의 최적 농도를 구하기 위하여 재조합 DNA 1.0 × 10⁵ 분자의 pSBPV-329를 사용하였으며, 각 10 μ M, 8 μ M, 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.25 μ M (각 최종농도)의 농도의 primer를 각각 사용하여 실험하였다. 특이 primer의 최적 농도는 가장 빠른 C_T 값과 최종 형광값을 기준으로 판단하였다.

고농도, 즉 10 μ M와 8 μ M의 primer를 사용한 초고속 PCR은 각각 7.96, 8.39 회전의 빠른 C_T 값을 보였고, 최종 형광값 또한 우수한 수준으로 측정되었다. 이 고농도 primer의 초고속 PCR은 4 μ M 또는 2 μ M의 중농도 primer를 사용한 초고속 PCR보다 12 회전이상 빠른 C_T 값을 보인 것으로, 이는 1.0 \times 10¹ 분자 이내의 극미량 초기 주형에 대한 증폭에서 보다 유리할 것으로 판단되었다. 그러나, 이 고농도 primer는 초고속 PCR의 안정성에서 불안정한 면을 보였으며, 1.0 \times 10⁵ 분자이상의 초기 주형을 사용하였을 경우 정량성이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다(자료 미제시).

이런 이유 등으로 SBPV 특이 초고속 PCR에서 최적 primer의 농도는 C_T (22.08 회전)와 C_T time (7분 59초)에서 빠른 검출시간을 보였으며, 최종 형광값(262) 모두에서 우수한 결과를 보인 2 μ M을 최적 primer 농도로 결정하였다(Fig. 1).

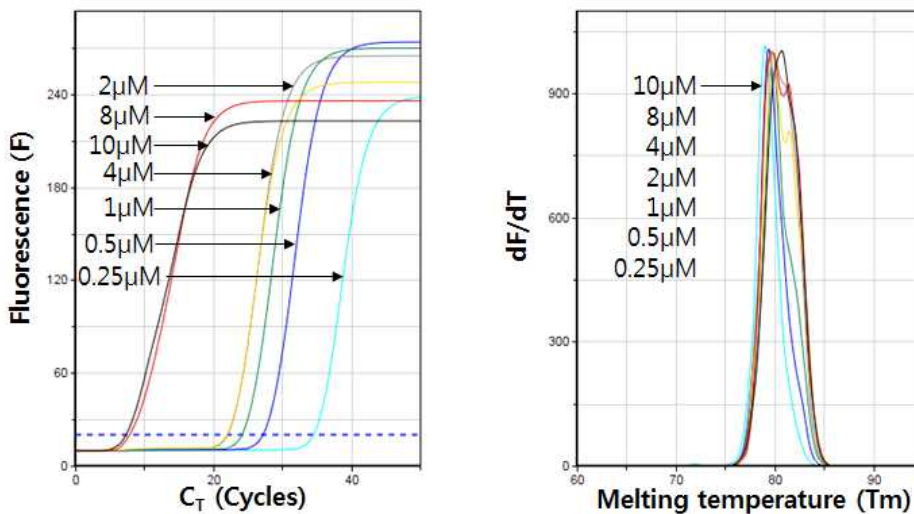


Fig. 1. Optimization of primer concentration using SBPV-specific Ultra-rapid PCR.

Using various concentrations of primers, optimal concentration of SBPV-specific primer were selected for Ultra-rapid PCR. At the final concentrations of 10 μ M and 8 μ M of primer, Ultra-rapid PCR showed the fastest C_T values of 7.96 and 8.39 cycles and the final fluorescence values were also measured to be excellent. However, when the concentration of the primer was set to 10 μ M and 8 μ M, the C_T values were unstable and no exact quantitative manner using higher numbers than 1.0 \times 10⁵ SBPV-specific molecules, as initial template. Based on these reasons, optimal concentration of specific primer was selected as 2 μ M each (C_T= 22.08 , C_T time= 7min 59sec, F= 262).

나. SBPV 특이 유전자의 최소 검출 시간에 따른 검출 한계 측정

PCR의 각 단계 시간 단축은 초고속 검출에 있어서 전체 검사 시간을 줄일 수 있는 가장 중요한 요소로써 작용한다. SBPV 유전자의 최단 검출 시간을 위해, PCR 각 단계(혼성, 중합)의 시간을 3초에서 1초까지 조절하여 초고속 PCR을 시행하였고 변성시간은 1초로 고정하여 초고속 PCR을 수행하였다.

1.0×10^3 분자인 pSBPV-329를 기질로 사용한 초고속 PCR에서 각 회전의 혼성시간을 3초에서 1초까지 조정 한 결과, 각 C_T 값은 3초에서 28.92 회전(C_T time= 9분 37초), 2초에서 29.89 회전(C_T time= 9분 30초)으로 측정되었으며 SBPV 특이 유전자의 증폭을 확인할 수 있었다. 혼성시간이 1초일 경우, DNA 증폭을 나타내는 형광곡선이 1.0×10^8 분자부터 1.0×10^0 분자까지 동일한 C_T 값인 6 회전에서 동시에 증폭됨을 볼 수 있어 정량적 측정이 불완전하다고 판단하였다. 같은 조건에서 각 혼성시간만 3초와 2초로 감소시킨 초고속 PCR을 비교한 결과, 해당 C_T 값이 혼성시간이 짧아질수록 증가하는 결과를 보여주었으며, C_T time은 혼성시간 2초에서 9분 30초로 혼성시간 3초와 비교했을 때, 7초 차이로 감소세를 보였다. 따라서 혼성시간을 3초에서 1초로 조정하여 비교하였을 때의 검출 가능 최소 혼성시간은 2초로 판단되었다.

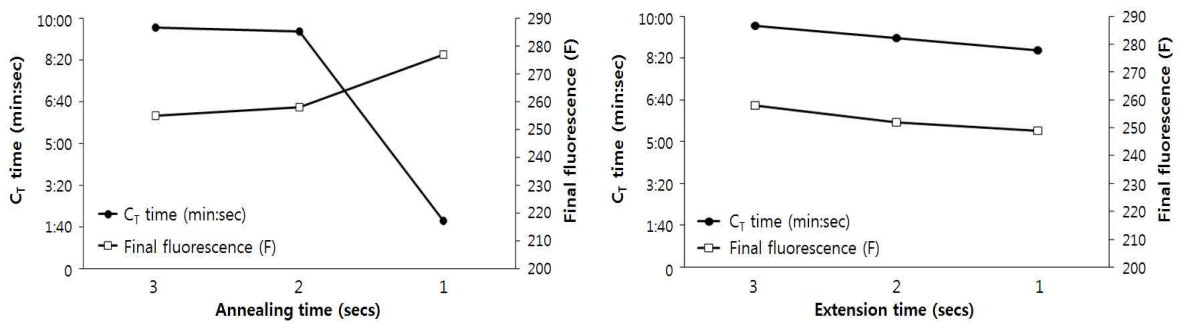


Fig. 2. Minimum time of annealing and/or polymerization in SBPV-specific Ultra-rapid PCR.

The annealing time and polymerization time were shortened to set the minimum detection time in SBPV-specific Ultra-rapid PCR. Denaturation step was fixed at 1 sec in each cycle of PCR and the times of annealing step and/or polymerization step were shortened from 3 sec to 1 sec.

1.0×10^3 분자인 pSBPV-329를 기질로 사용한 초고속 PCR에서 각 회전의 중합시간을 3초에서 1초까지 조정한 결과, 각 C_T 값은 3초에서 29.89 회전(C_T time= 9분 30초), 2초에서 29.97 회전(C_T time= 9분 1초), 1초에서 30.02 회전(C_T time= 8분 31초)으로 측정되었으며 SBPV 특이 유전자의 증폭을 확인할 수 있었다. 같은 조건에서 각 중합시간만 3초, 2초, 1초로 감소시켰을 때, 해당 C_T 값은 중합시간이 짧아질수록 증가하는 결과를 보여주었으나, C_T time에서는 점차 감소하는 양상을 보였다. C_T time은 중합시간 1초에서 8분 31초로 중합 시간 3초와 비교했을 때, 59초 차이로 큰 감소세를 보였다. 따라서 중합시간을 3초에서 1초로 조정하여 비교하였을 때의 검출 가능 최소 중합시간은 1초로 판단되었다(Fig. 2).

한편, 변성, 혼성, 중합시간을 각 1초, 2초, 1초로 단축한 결과, DNA 증폭을 나타내는 형광곡선은 초기주형량에 따라 정상적인 증가를 보여주었으며 1.0×10^1 분자까지 SBPV 특이 유전자의 증폭을 확인할 수 있었고 1.0×10^2 분자까지 정량적으로 검출됨을 확인하였다. 또한 혼성시간을 1초 조정한 1초, 1초, 3초 조건으로 하였을 때, DNA 증폭을 나타내는 형광곡선이 1.0×10^8 분자부터 1.0×10^0 분자까지 동일한 C_T 값에서 동시에 증폭됨을 볼 수 있어 정량적 측정이 불가능하다고 판단하였다(Supplement Fig. S1).

따라서 SBPV 특이 초고속 PCR은 PCR 시스템의 안정성 또한 고려하여 각 회전의 변성, 혼합, 중합 시간을 각각 1초, 2초, 1초로 수행하였다.

또한, SBPV 특이 초고속 PCR에서 SBPV 유전자의 특이 증폭을 위한 최소 검출 시간을 측정하였다. 1.0×10^8 pSBPV-329 분자를 주형으로 사용하였으며, 최적화된 SBPV 특이 초고속 PCR의 조성으로, 최적화된 온도조건하에 각 변성, 혼성, 중합 시간을 각 1초, 2초, 1초로 설정하고 50 회전을 수행하였다. 초기 변성 15초 후, 12.60 회전만에 C_T line에 도달하였으며, C_T time은 3분 35초였다. 37 회전(C_T time은 10분 31초) 전후에 최대 형광값을 보여주었으며, 50 회전의 초고속 PCR은 15분 45초에 종료되었다(Supplement Table S2).

다. SBPV 특이 초고속 PCR의 검출한계 및 정량 범위

SBPV 특이 초고속 PCR의 안정적 시간 조건(각 회전 중 변성, 혼성, 중합시간 각 1초, 2초, 1초)에서 SBPV 유전자의 최소 검출한계를 확인하였다. SBPV 특이 유전자 재조합 DNA 1.0×10^8 분자를 연속 희석하여, 1.0×10^0 분자까지 초고속 PCR의 주형으로 사용하여 각 초기 주형수에 따른 검출한계를 측정하였다(Fig. 3).

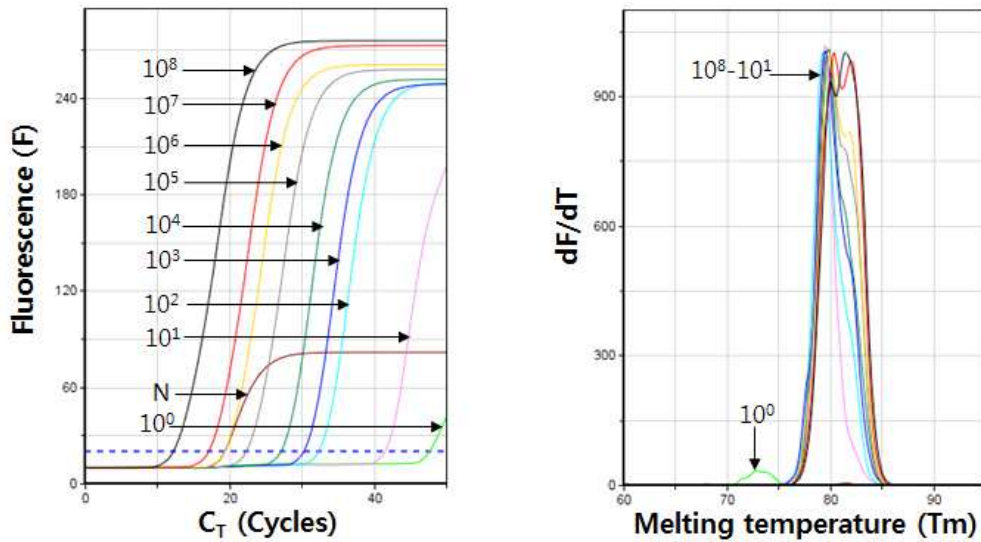


Fig. 3. Detection limit of SBPV-specific Ultra-rapid real-time PCR with 10-fold diluted specific DNAs.

The detection limit of SBPV gene was estimated using SBPV specific Ultra-rapid PCR under the minimum times of thermocycling (1 sec of denaturation, 2 sec of annealing, 1 sec of polymerization in single cycles). Until 1.0×10^1 molecules of pSBPV-329, specific products were amplified, respectively. Tms of all PCR products were measured as $80.45 \pm 1.15^\circ\text{C}$, except 1.0×10^0 molecule and PCR product using non template.

상기 조건에서 SBPV 유전자는 1.0×10^1 분자의 초기 주형에서도 성공적으로 증폭이 가능함을 보여 주었다. 10배씩 감소시킨 초기분자량 간의 C_T 값의 차이를 dC_{T10} 라 정의하며, 1.0×10^8 분자에서 1.0×10^2 분자까지의 평균 dC_T 값은 약 3.20 회전으로 계산되었다. 1.0×10^1 분자의 초기 주형에서 평균 C_T 값은 40.74 회전이었고, 평균 C_T time은 11분 45초이었고, T_m 값 또한 79.63°C 로 SBPV의 유효범위에 포함되었다. 따라서 안정적인 검출에 필요한 주형의 양은 1.0×10^1 분자 이상이라 판단하였다.

SBPV 특이 유전자 대신 증류수를 넣어준 SBPV 특이 초고속 PCR (N; non-template, Fig. 4)은 19 회전 부근에서 C_T line을 넘는 증폭이 관찰되었으나, 이 T_m 값은 측정되지도 않는 낮은 수준의 산물을 생성한 것으로 보이며, 이는 특이적 증폭이 아닌 것으로 판단할 수 있었다. 또한 1.0×10^0 분자의 증폭에서도 46 회전 부근에서 C_T line을 넘는 증폭이 관찰되었으나 이 또한 T_m 값이 그래프상에서 측정되지도 않아 특이적 증폭이 아닌 것으로 판단하였다.

한편, 재조합 DNA인 pSBPV-329를 사용한 초고속 PCR에서 연속 희석된 주형 DNA의 양에 따라 각 C_T 값이 측정되었으며, 이에 따른 회귀식(Regression equation)은 $y = -3.2586x + 39.234$ ($y =$ 초기 SBPV의 분자수)로, 이 때 회귀 상수(Regression coefficient)는 $R^2=0.9900$ 이었다.

또한, 정확한 정량을 위한 정량 가능 범위는 주형 DNA가 1.0×10^2 분자 이상 1.0×10^8 분자까지라 판단하였으며, 이를 정량가능범위로 정하였다(Fig. 4).

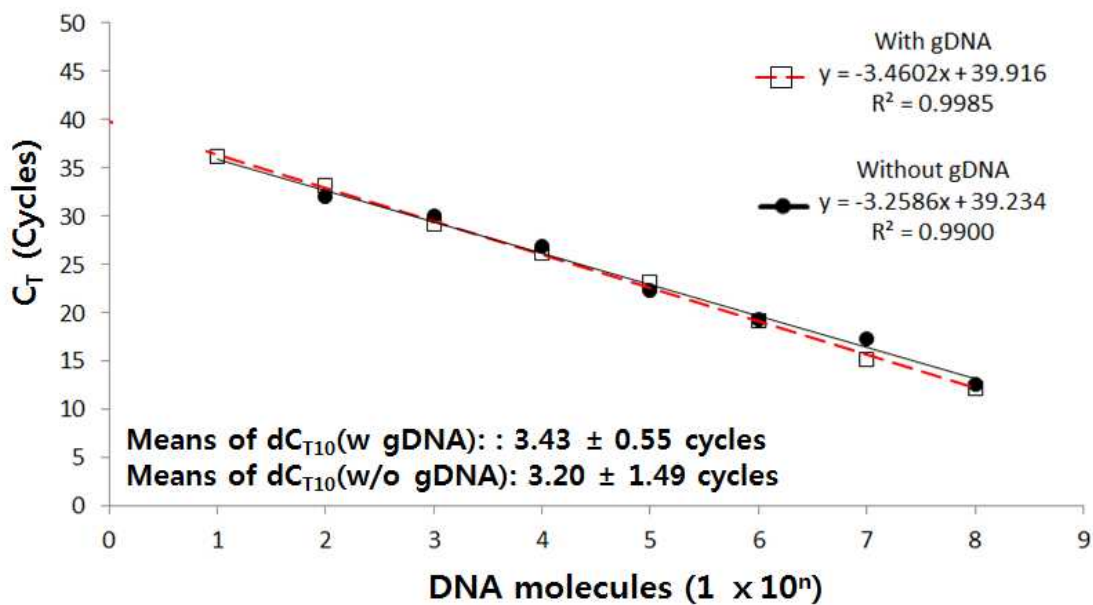


Fig. 4. Regression equation based on SBPV molecules and C_T using SBPV-specific Ultra-rapid PCR.

dC_T indicates difference between each C_T values (cycles) of PCRs using 10-fold diluted initial templates. Means of dC_{T10} is 3.20 ± 1.49 cycles. Quantitative measurement was possible from 1.0×10^8 molecules to 1.0×10^2 molecules. At the detection limit in the presence of bumblebee gDNA, means of dC_{T10} is 3.43 ± 0.55 cycles. Quantitative measurement was possible from 1.0×10^8 molecules to 1.0×10^1 molecules.

라. 뒤영벌 gDNA 존재하에 SBPV 특이 초고속 PCR의 검출한계 및 정량 범위

뒤영벌 gDNA 존재하에 SBPV 특이 초고속 PCR의 안정적 시간 조건(각 회전 중 변성, 혼성, 중합시간 각 1초, 2초, 1초)에서 SBPV 유전자의 최소 검출한계를 확인하였다. 100ng의

뒤영벌 gDNA와 함께 SBPV 특이 유전자 재조합 DNA 1.0×10^8 를 연속 희석하여, 1.0×10^0 분자까지 초고속 PCR의 주형으로 사용하여 검출한계를 측정하였다(Fig. 5).

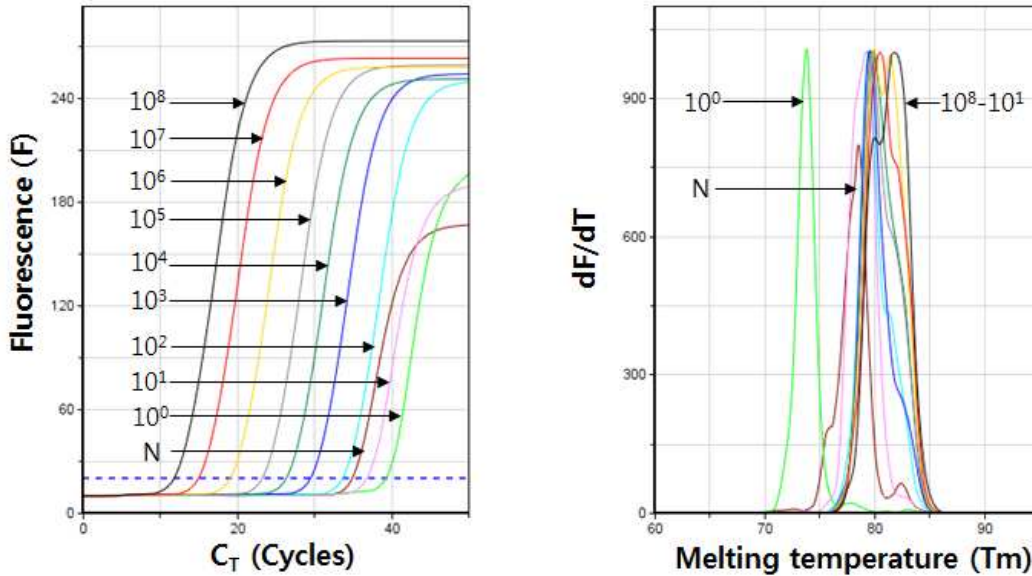


Fig. 5. Detection limit of SBPV-specific Ultra-rapid real-time PCR with 10-fold serial diluted specific DNAs with gDNA of bumblebee.

The detection limit of SBPV specific genes with gDNA of bumblebee was estimated using SBPV specific Ultra-rapid real-time PCR under the minimum times of thermocycling (1 sec of denaturation, 2 sec of annealing, 1 sec of polymerization in each cycle). As initial template, until 1.0×10^1 molecules of pSBPV-329 was also amplified. T_ms of all PCR products were measured as $80.47 \pm 1.32^\circ\text{C}$, except PCR products from 1.0×10^0 molecule and non template.

100ng 뒤영벌 gDNA의 존재하에서도 SBPV 특이 유전자는, 1.0×10^1 분자의 초기 주형까지, 성공적으로 증폭되었다. 초기주형의 분자수를 10배 희석시킨 PCR의 C_T 값 차이인, dC_{T10}을 각기 계산하였으며, 1.0×10^8 초기 주형 분자에서 1.0×10^1 분자까지 계산된 각 dC_{T10}의 평균 dC_{T10} 값은 약 3.43 회전으로 계산되었다. 이는 뒤영벌 gDNA의 첨가 없이 수행된 같은 초고속 PCR결과(Fig.3 및 Fig.4)와 매우 유사한 값으로, SBPV-특이 초고속 PCR은 초기 주형에 100ng 뒤영벌 gDNA를 사용한 것과 정량 및 정성의 면에서 무관하며, 간섭이 없었음을 보여주었다.

증류수만을 초기 주형 대신 사용한 SBPV 특이 초고속 PCR은 34 회전 부근에서 C_T line을 넘는 증폭이 관찰되었으나(N; non-template, Fig. 5), 융점 분석을 통해 SBPV의 유효범위인 80.47°C와 큰 차이를 보이는 78.49°C로 측정되어 특이적 증폭이 아님을 쉽게 확인할 수 있었다. 1.0 × 10⁰ 분자의 SBPV 특이주형에서도 증폭함을 확인하였으나 융점 분석을 통해 SBPV의 유효범위인 80.47°C와 큰 차이를 보이는 73.87°C로 측정되어 특이적 증폭이 아님을 쉽게 확인할 수 있었다.

뒤영벌 gDNA 100ng의 존재하에, 연속 희석된 재조합 DNA pSBPV-329를 사용한 SBPV 특이 초고속 PCR에서 각 C_T값이 측정되었으며, 이에 따른 회귀식(Regression equation)은 $y = -3.4602x + 39.916$ (y= 초기 SBPV의 분자수)로, 회귀 상수(Regression coefficient)는 R²=0.9985이었다(Fig. 4).

마. SBPV 감염 의심 뒤영벌 사체에서의 SBPV 특이 초고속 RT-PCR을 통한 검출

SBPV 특이 초고속 PCR의 현장 적용성을 검증하기 위하여, SBPV 감염이 추정되는 국내외 생산 뒤영벌 시료들로부터 total RNA를 분리하였으며, 해당 뒤영벌 한 마리로부터 회수한 total RNA 100ng을 사용하여 SBPV 특이 초고속 RT-PCR을 수행하였다. 결과로써, SBPV 감염이 추정되던 시료들 중 일부, 벨기에 수입 뒤영벌, 그리고 국내 생산 1개 시료로부터 SBPV 존재에 대한 양성반응을 판정할 수 있었다(Fig. 6).

Table 2. C_T and T_m value of SBPV-specific UR-PCR with bumblebee sample

Sample	Negative	Positive(10 ⁵ /10 ²)	Suwon	Boseong	Belgium	Cheongsong
C _T	40.83	23.4/ 33.39	41.20	48.35	41.62	41.65
T _m	75.52	79.15/79.15	79.48	0.00	79.15	0.00
Result	-	+	+	-	+	-

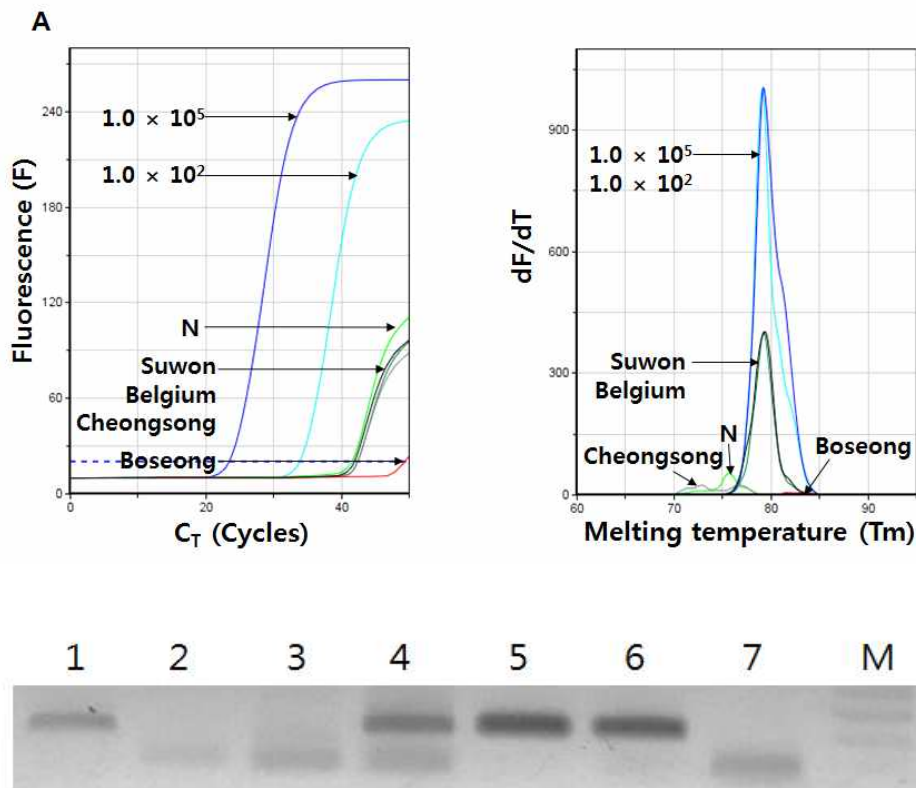


Fig. 6. SBPV specific UR-RT PCR with various bumblebee samples.

UR-PCR was performed with 100ng total RNA from each sample as initial templates. The Reverse transcription condition was 50°C, 1 min and the PCR condition was 95°C, 15 sec of pre-denaturation, 95°C, 1 sec of denaturation, 59°C, 2 sec of annealing, 72°C, 1 sec of polymerization in each cycle for 50 cycles. SBPV specific gene was amplified from the samples of Belgium and Suwon. Panel A is the fluorescent graph of amplification and the peak graph of Tm of each amplicon. Panel B is amplified DNAs on the agarose gel. Lane 1 is sample from Suwon. Lane 2 is from Boseong. Lane 3 is Cheongsong. Lane 4 is Belgium sample. Lane 5, 6 are 1.0×10^5 molecules and 1.0×10^2 molecules of pSBPV-329, respectively. Lane 7 is non-template.

SBPV 특이 초고속 PCR 결과, 수원(Suwon)과 벨기에(Belgium)에서 생산된 뒤영벌 시료에서 SBPV 특이 유전자 증폭이 관찰되었으며, 각 산물의 융점분석에서 SBPV 특이 유전자의 증폭으로 판단되었다. 측정된 SBPV의 Tm 값은 수원 79.48°C, 벨기에 79.15로, SBPV의 양성 증폭의 유효범위(80.47±1.32°C) 안에 해당함으로 SBPV 유전자의 증폭으로 판정한 것이다 (Table 2).

뒤영벌 사체에 포함되어 있는 SBPV 양은 Fig. 5의 회귀식에 기반하여 계산한 결과, 수원은 4.76×10^3 분자/마리, 벨기에는 4.82×10^3 분자/마리로 계산되었으며, 상기의 결과는 SBPV가 국내에서 판매되고 있는 뒤영벌의 사체에 실제로 존재함을 보여주는 것이다.

본 PCR법을 뒤영벌 사육 현장에서 보다 쉽게 사용하기 위해서는, 성봉 또는 유충으로부터 보다 간소화된 핵산 추출법의 개발이 필요로 하며, 이러한 간편 핵산 추출법과 본 초고속 RT-PCR법이 연합될 수 있다면, 바로 현장에서 유전자 검사를 빠르게 수행하여 SBPV의 감염 여부를 수 분 내에 판정할 수 있을 것이다. 더 나아가 뒤영벌의 다른 바이러스에 대하여 현장성을 보완한 신속한 검출법 개발로 연구가 확장될 것으로 기대하며 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준을 이용하여 집단적 발병 방지에 기여할 수 있기를 기대한다.

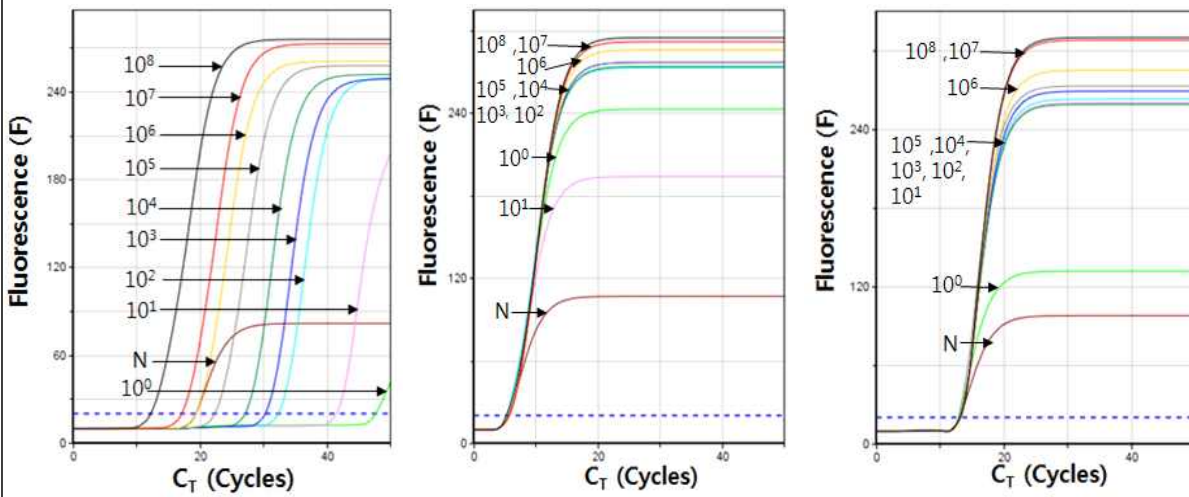
4. 결론 및 요약

Slow Bee Paralysis Virus (SBPV)는 꿀벌 그리고 뒤영벌의 병원성 바이러스로써, 벌의 앞발을 마비시킴으로 폐사를 야기한다. 본 연구는, 뒤영벌에서 빠르게 SBPV 검출하고자 SBPV 특이 초고속 PCR법을 개발한 것을 보고하는 것이다.

SBPV 특이 초고속 PCR은 제반 조건을 최적화한 후, 1.0×10^8 분자의 SBPV 특이 유전자의 존재를 3분 35초 만에 인식할 수 있었으며, 최소 1.0×10^1 분자의 DNA까지 정량적으로 측정할 수 있었다. 한편, 국내외에서 생산된 뒤영벌을 시료로 SBPV 특이 초고속 역전사 PCR을 시행하였으며, 수입된 뒤영벌과 국내 생산 뒤영벌 1종에서 SBPV가 존재함을 보일 수 있었다. 국내 처음으로 뒤영벌에서의 SBPV의 존재를 확인한 것이다.

SBPV 특이 유전자 초고속 역전사 PCR법은 실험실 내에서 뿐만 아니라 현장에서 정량적 검출을 하기에 유용한 방법이 될 것이며 더 나아가 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준을 이용하여 집단적 발병 방지에 기여하기를 기대한다.

5. Supplement data



Denaturation-Annealing-Polymerization

1sec-2sec-1sec

1sec-1sec-3sec

1sec-1sec-1sec

Supplement Figure S1. Comparison of fluorescence graphs according to time reduction

Supplement Table S1. Other SBPV primer information.

Name of primers	Sequence (5' → 3')
SBPV F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG
SBPV detection F	GGGTGATCATGCTAATGTCTG
SBPV-C3G peptidase F	GAGCATCCAGTTGTTTCGTTTC
SBPV R	ATAGGGCTGCATGTTGCTGGT
SBPV detection R	ATAGGGCTGCATGTTGCTGG
SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA

pLF-159 DNA molecules	Denaturation-Annealing-Polymerization					
	1sec-2sec-1sec			1sec-1sec-3sec		
	C_T	dC_{T10}	C_T time	C_T	dC_{T10}	C_T time
1.0×10^8	12.60	-	3min	5.96	-	1min
			35sec			50sec
1.0×10^7	17.29	4.69	4min	6.31	0.35	1min
			55sec			56sec
1.0×10^6	19.40	2.11	5min	6.31	0.00	1min
			31sec			56sec
1.0×10^5	22.30	2.9	6min	6.31	0.00	1min
			20sec			56sec
1.0×10^4	26.98	4.68	7min	6.31	0.00	1min
			40sec			56sec
1.0×10^3	30.02	3.04	8min	6.31	0.00	1min
			32sec			56sec
1.0×10^2	32.00	1.98	9min	5.96	0.35	1min
			6sec			50sec
1.0×10^1	40.74	8.74	11min	6.31	0.35	1min
			35sec			56sec
1.0×10^0	-	-	-	6.31	0.00	1min
			-			56sec
Mean of dC_{T10}			5.99		2.26	

Supplement Table S2. Comparison of C_T , dC_{T10} , and C_T time of SBPV-specific gene according to time reduction.

6. 특허 출원

본 절의 내용은 대한민국 특허, 출원번호 10-2018-0007200 (접수번호 1-1-2018-0067549-71), 발명의 명칭 “초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌의 병원체 SBPV의 검출방법”으로 2018.01.19.일 출원되었음.

제 2 절 초고속 유전자 증폭법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체인 *Lysinibacillus fusiformis*의 신속검출법

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 32(3): 181-189 (2017)에 Rapid Detection for *Lysinibacillus fusiformis*, a Suspicious Pathogen of *Bombus terrestris*, using Ultra-Rapid PCR의 제목으로 발표된 것임>

1. 서 론

Lysinibacillus fusiformis 는 비운동성 그람양성 간균으로, 1901년 처음 발견되었다. *L. fusiformis* 는 2007년까지 *Bacillus fusiformis* 라 알려졌으나, *Bacillus* 속이 세분화 되면서 세포벽에 L-lysine을 포함한다는 이유 등으로 *Lysinibacillus* 속이 독립되었으며, 새롭게 *L. fusiformis* 로 분류되었다(Ahmed I *et al.*, 2007). 또한, *L. fusiformis* 는 일명 복어독으로 알려진 중추신경계를 마비시키는 신경독인 Tetrodotoxin의 생성균주로 알려져 다른 의미에서 주목 받은 바가 있었다(Wang *et al.*, 2010).

뒤영벌에 감염 또는 기생하는 생물체는 바이러스, 세균, 응애류 등을 포함하여 100종이 넘는 것으로 보고되고 있다. 수입된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에서 기생성 응애가 발견되고 그 심각성이 보고된 바 있으며(Schmid-Hempel, 2001), 국내에서는 실내사육 중인 호박벌(*Bombus ignitus*)의 유충에서 석고병균(*Aspergillus flavus* Link)이 분리 된 바가 있었다(남 등, 2003), 또한 최 등(2009)과 최 등 (2010)에서는 꿀벌의 바이러스가 뒤영벌류에 교차 감염되는지 여부를 확인하였으며 그 결과 국내의 서양뒤영벌에서 7종의 바이러스가 교차 감염 되는 것을 처음으로 확인하였다.

L. fusiformis 가 뒤영벌의 병원체로써 의심되기 시작된 것은 화분매개 곤충으로 사육된 서양뒤영벌의 급작스러운 폐사에서, 이 원인을 규명하고자 사충에서 병원성 세균들을 분리 동정하였고, 이 연구에서 *L. fusiformis* 가 동정된 이후이다(김 등, 2008). 하지만 이는 *L. fusiformis* 가 초기 감염세균으로 뒤영벌에 감염되어 뒤영벌을 치사시킨 것인지, 또는 사체가 된 후에 이차 침입 세균으로 사체에서 단순 성장된 것인지 현재로써 판단하기는 어려운 것이 현실이다.

현재까지 *L. fusiformis* 검출에 대한 연구는 뒤영벌의 다양한 병원체들에 대한 실시간 다중 PCR법(민 등, 2017)에서 처음 제시된 바 있었으나, *L. fusiformis*의 검출을 위한 보다 현장 적용성이 있고, 신속한 방법은 개발된 바 없었다. 또한, 국내의 뒤영벌에서 *L. fusiformis*를 검출한 연구는, 앞서 언급한 김 등(2008)의 분리 동정 연구 외에 찾아볼 수 없었으며, 국내 뒤영벌에서 이들의 감염 현황을 파악하는 것은 유관된 자료조차 찾기 어려웠다.

한편, 초고속 PCR (Ultra-Rapid PCR)은 특이 유전자를 10분 이내 증폭해 낼 수 있는 PCR 기법을 말하며(Han *et al.*, 2008), 근래 더욱 발전되어 SHB (Small Hive Beetle)의 특이 유전자 검출, 꿀벌 병원체들의 초신속 검출 등에 적용되어, 수 분내 목적인 특이유전자를 증폭하여 이의 존재를 정량적으로 증명할 수 있음을 보여주었다(김 등, 2017; 임 등, 2017)

따라서, 본 연구에서는 초고속 PCR법을 적용하여 서양뒤영벌의 병원체로 의심되는 *L. fusiformis*의 가장 빠른 검출 조건을 수립하여, 이를 통해 *L. fusiformis*의 뒤영벌 병원체 여부를 판단하는 연구에 앞서 이를 정량적으로 검출하는 방법을 제시하고자 하였다. 또한, 국내에서 판매되고 있는 화분매개용 뒤영벌 사체에서 병원체의 존재여부를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. *Lysinibacillus fusiformis* 표준균주 및 배양

Lysinibacillus fusiformis 표준균주인 ATCC 7055를 KCTC에서 분양 받았으며, *L. fusiformis* 및 관련 재조합 균주들은 표준 LB배지(Biobasic, Korea)에서 37°C, 16시간을 기준으로 배양하여 사용하였다.

나. 뒤영벌 시료 확보 및 genomic DNA의 추출

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 수원, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 창원에서 구입된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 사용하였다.

뒤영벌 genomic DNA (gDNA)의 분리를 위하여, 먼저 시료를 분쇄하였으며, 이는 뒤영벌 성충 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size: 1mm, Germany)와 혼합 후, MagNa Lyser (Roche, Switzerland)에 넣고, 6,000 rpm으로 분쇄하는 것이었다. 분쇄액은 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)의 방법을 따라 gDNA를 분리하였으며, 추출된 Total gDNA는 spectrophotometer로 260 nm에서 흡광도로 정량하고, -70°C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

L. fusiformis 의 gDNA 분리 또한 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)의 방법을 따랐으나, *L. fusiformis* 가 gram-positive인 점을 감안하여 침전시킨 세균을 99℃에서 5분간 끓여준 뒤, 상기 kit의 gDNA 분리 방법을 적용하였다. 추출된 Total gDNA를 spectrophotometer로 정량하고, -70℃에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

다. *L. fusiformis* 특이 유전자의 재조합 DNA 제작 및 Primer 선별

L. fusiformis 특이 유전자 재조합 DNA (pLF-159)는, 경기대학교 생명과학과 분자생물학 연구실에 확보된 것을 사용하였으며(민 등, 2017), 이는 GenBank CP010820.1 (*L. fusiformis* full genome)의 4568067-4568195를 탑재하고 있다. pLF-159는 *L. fusiformis* 초고속 검출법의 최적화를 위한 표준으로 사용되었으며 추후 실제 뒤영벌에서의 병원체 검출의 표준 DNA로써 검출여부 판단에 사용되었다. *L. fusiformis* 의 Glutamyl tRNA amidotransferase 유전자를 증폭하는 *L. fusiformis* 특이 프라이머 한 쌍을 사용하였다(Table 1).

Table 1. *Lysinibacillus fusiformis* specific primers

Name of primers	Sequence (5' → 3')	PCR amplicon size (bp)	Reference
L.fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGTATTTTCAC	129	민 등, 2017
L.fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCTTATC		

라. *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

초고속 PCR의 최적화를 위하여, 주형으로 재조합 DNA pLF-159를 사용하였으며, OD260 (Optical Density 260nm)으로 정량한 후, 1.0×10^6 분자를 기준으로 초고속 PCR에 사용하였다. 초고속 PCR 기기는 GENECHECKER (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 95℃ 초기 변성 15초 후, 95℃ 변성 3초, 혼성 3초, 72℃ 중합 3초를 기준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다. 최적 annealing 온도는 55-65℃ 범위에서 구하였으며, 최적의 primer 농도는 10μM, 8μM, 4μM, 2μM, 1μM, 0.5μM, 0.25μM에서 각기 C_T (Threshold Cycles)값과 최대 형광값을 고려하여 조정하였다. 이후, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 상기의 기준조건부터 최적 혼성온도와 시간을 C_T 값과 최대 형광값을 기준으로 재조정하였다.

마. *L. fusiformis* 특이 유전자의 최소 검출 시간에 따른 검출 한계 초기주형량 측정

L. fusiformis 특이 초고속 PCR의 최소 검출 시간에서 특이 검출의 한계를 측정하기 위하여 초고속 PCR의 각 회전 중 변성, 혼성, 중합의 시간을 각각 3초에서 1초까지 감소시켜 각 온도와 시간 조건에 따른 C_T 값과 C_T 값이 측정되는 시간(C_T time)을 측정하였다. 이 측정에서는 재조합 DNA인 pLF-159를 1.0×10^8 분자부터 1.0×10^0 분자까지 연속 희석하여, 초고속 PCR의 주형으로 사용하였으며, 초고속 PCR의 각 단계에서 시간 및 온도 조건도 가감하여, *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR이 최소 검출 시간 내에 검출 가능한 최소 초기 기질의 한계주형량을 도출하였다.

바. *L. fusiformis* gDNA를 이용한 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR 정량

L. fusiformis 특이 초고속 PCR에 적합한 *L. fusiformis* gDNA 사용량을 정하기 위하여, 또한 재조합 DNA pLF-159를 사용하여 구한 정량식의 보정을 위하여, *L. fusiformis* 에서 추출한 gDNA를 주형으로, 다양한 초기주형량에 대한 *L. fusiformis* 특이 유전자의 증폭을 측정하였다.

PCR 반응은 5 μ l의 2 \times Rapi master mix와 1 μ l씩의 *L.fusi* detection F2/R2(최종 농도 4 μ M) 프라이머에 *L. fusiformis* gDNA(최고 50ng에서 최저 1ng까지 희석)을 첨가하여 총 10 μ l로 조성하여 수행하였으며, 이때의 positive control로써 1.0×10^6 분자의 *L. fusiformis* 유전자를 포함하는 재조합 DNA를 사용하여 *L. fusiformis* PCR 산물의 합성 유무와 특이 T_m (Temperature of midpoint)값을 비교하였다. 초고속 PCR의 각 단계에서 시간 및 온도 조건은 앞서 실험에서 최적화한 조건을 사용하여 95 $^{\circ}$ C 초기 변성 15초 후, 95 $^{\circ}$ C 변성 1초, 혼성 2초, 72 $^{\circ}$ C 중합 2초를 표준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다.

사. 국내 뒤영벌에서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR을 적용한 검출

국내에 판매되고 있는 서양뒤영벌의 *L. fusiformis* 감염여부를 판단하기 위하여, 경기도 수원, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 창원에서 생산된 뒤영벌 각 1마리에 대하여 gDNA를 분리하였다. gDNA는 각 50ng을 사용하여 뒤영벌에 대하여 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 5 μ l의 2 \times Rapi master mix와 1 μ l씩의 *L.fusi* detection F2/R2(최종 농도 4 μ M) 프라이머로 총 10 μ l로 조성하여 수행하였다. *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR은 GENE CHECKER (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C, 15초 초기 변성 후, 95 $^{\circ}$ C, 1초 변성, 57 $^{\circ}$ C, 2초 혼성, 72 $^{\circ}$ C, 2초 중합의 조건으로 50 회전을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

L. fusiformis 특이 초고속 PCR에서 최적의 혼성 온도를 파악하고자 재조합 DNA 1.0×10^6 분자의 pLF-159를 사용하였으며, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 95°C 초기 변성 15초 후, 95°C 변성 3초, 55-65°C 혼성 3초, 72°C 중합 3초를 표준으로 총 50 회전 진행하였다.

가장 빠른 C_T 는 혼성 온도 57°C일 때 23.28 회전으로 측정되었으며, 이에 이르기까지 소요된 PCR 진행 시간(C_T time)은 10분 44초이었다. 따라서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR에서 최적 혼성 온도는 C_T 값(23.28 회전), 최종 형광값(증폭량, $F=221$) 모두에서 우수한 결과를 보인 57°C로 결정하였다(Fig. 1).

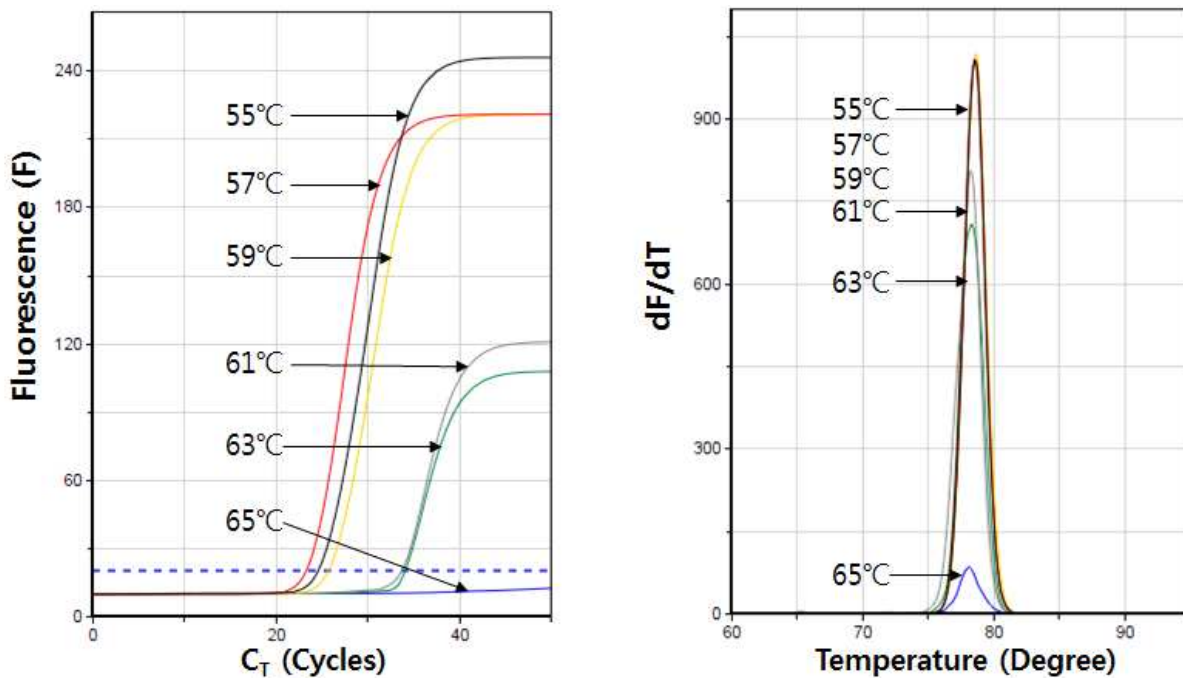


Figure 1. Optimization of annealing temperature using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR.

The optimal annealing temperature for the Ultra-rapid real-time PCR was tested in the range from 55°C to 65°C, the lowest C_T of 23.28 cycles and the fastest C_T time of 10 minutes 44 seconds was measured on 57°C, annealing temperature.

또한, 초고속 PCR에서 *L. fusiformis* 특이 primer의 최적 농도를 구하기 위하여 각 10 μ M, 8 μ M, 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.25 μ M의 농도의 primer를 각각 사용하여 실험하였다. 특이 primer의 최적 농도는 가장 빠른 C_T 값과 최종 형광값을 기준으로 판단하였으며, 최종 농도 4 μ M에서 초고속 PCR은 가장 빠른 20.28 회전의 C_T 값을 보였으며, 최종 형광값 또한 가장 높게 측정되었다. 따라서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR에서 최적 primer의 농도는 C_T (20.28 \pm 0.08 회전)와 C_T time (7분 56초)에서 가장 빠른 검출시간을 보였으며, 최종 형광값(223 \pm 17.67) 모두에서 가장 우수한 결과를 보인 4 μ M을 최적 프라이머 농도로 결정하였다(Fig. 2).

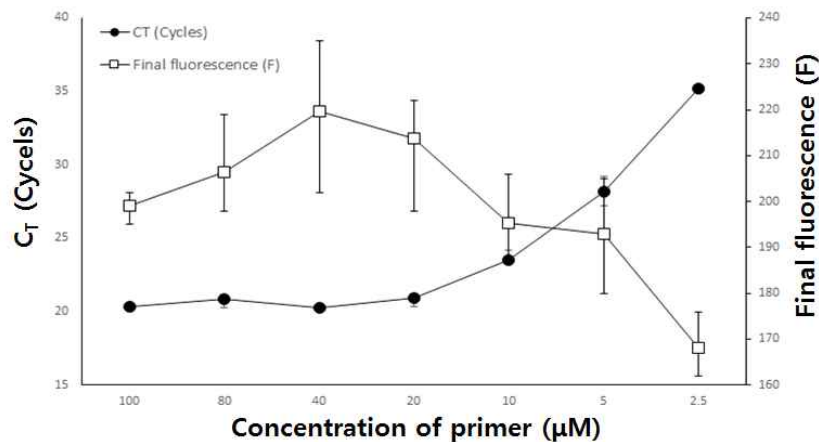


Figure 2. Optimization of primer concentration using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR.

Using various concentration of primers, optimal concentration of *L. fusiformis*-specific primer were selected for Ultra-rapid PCRs. Using each 4 μ M primers, C_T was estimated the lowest cycles than others. Also, C_T time was estimated the fastest time than others. Based on this reasons, optimal concentration of primer was selected as 4 μ M (C_T = 20.28 \pm 0.08 , C_T time= 7min 56sec, F= 223 \pm 17.67).

나. *L. fusiformis* 특이 유전자의 최소 검출 시간에 따른 검출 한계 측정

PCR의 각 단계의 시간 단축은 초고속 검출에 있어서 전체 검사 시간을 줄일 수 있는 가장 중요한 요소로써 작용한다. *L. fusiformis* 유전자의 최단 검출 시간을 위해, PCR 각 단계(혼성, 증합)의 시간을 3초에서 1초까지 조절하여 초고속 PCR을 시행하였고 변성시간은 1초로 고정하여 실험을 수행하였다.

1.0 × 10³ pLF-159 분자를 기질로 사용한 초고속 PCR에서 각 회전의 혼성 시간을 3초로 조정된 결과, C_T 값은 28.77 회전으로 감소되었으며, C_T time은 9분 40초만에 *L. fusiformis* 특이 유전자의 증폭을 확인할 수 있었다. 같은 조건에서 각 혼성시간만 2초, 1초로 감소시킨 초고속 PCR은 해당 C_T 값이 혼성시간이 짧아질수록 증가하는 결과를 보여주었으며, 해당 C_T time은 다소 증감하는 양상을 보였지만 혼성단계를 2초로 주었을 경우 분명한 감소세를 보여주었다.

PCR 반응에서 중합 시간 또한 3초, 2초, 1초로 감소시킨 결과, 1초의 중합시간을 준 초고속 PCR에서 C_T time은 8분 29초로 중합시간이 3초였을 때와 비교해보면, 1분 이상의 차이로 크게 감소한 것이 측정되었다. 이는 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR의 각 변성, 혼성, 중합 시간을 1초로 설정하여도 특이 증폭이 가능함을 보여준 것이다(Fig. 3).

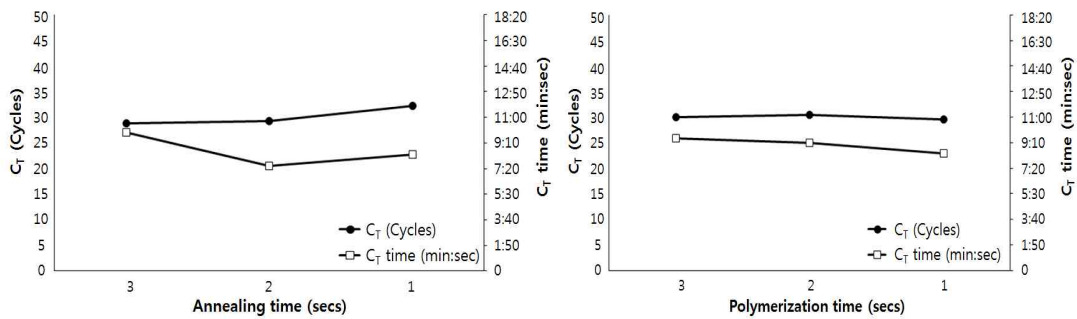


Figure 3. Minimum time of annealing and/or polymerization in *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR.

The annealing time and polymerization time were shortened to set the minimum detection time in *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. Denaturation step was fixed at 1 sec in each cycle of PCR and the times of annealing step and/or polymerization step were shortened from 3 sec to 1 sec.

한편, 변성, 혼성, 중합시간을 각 1초, 2초, 1초로 단축한 결과, DNA 증폭을 나타내는 형광곡선은 초기주형량에 따라 비교적 정상적인 증가를 보여주었으나 1.0 × 10³ 분자 이하의 초기 주형 DNA의 증폭에서 크게 왜곡됨이 빈번하게 나타났다. 또한 변성, 혼성, 중합시간을 각 1초, 1초, 1초로 단축한 최단 시간 조건은 DNA 증폭을 나타내는 형광곡선이 1.0 × 10⁸ 분자 부터 1.0 × 10⁰ 분자까지 동일한 C_T값에서 동시에 증폭됨을 볼 수 있어 정량적 측정이 불가능하다고 판단하였다(Fig. S1).

따라서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR은 PCR 시스템의 안정성 또한 고려하여 각 회전의 변성, 혼합, 중합 시간을 각 1초, 2초, 2초로 수행하였다.

또한, *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR에서 *L. fusiformis* 유전자의 특이 증폭을 위한 최소 검출 시간을 측정하였다. 1.0×10^8 pLF-159 분자를 주형으로 사용하였으며, 최적화된 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR의 조성으로, 최적화된 온도조건하에 각 변성, 혼성, 중합 시간을 각 1초, 2초, 2초로 설정하고 50 회전을 수행하였다. 초기 변성 15초 후, 13.59 회전만에 C_T line에 도달하였으며, C_T time은 4분 8초였다. 38 회전(C_T time은 11분 34초)전후에 최대 형광값을 보여주었으며, 50 회전의 초고속 PCR은 16분 47초에 종료되었다(Table S1).

다. *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR의 검출한계 및 정량 범위

L. fusiformis 특이 초고속 PCR의 안정적 시간 조건(각 회전 중 변성, 혼성, 중합시간 각 1초, 2초, 2초)에서 *L. fusiformis* 유전자의 최소 검출한계를 확인하였다. *L. fusiformis* 특이 유전자 재조합 DNA 1.0×10^8 를 연속 희석하여, 1.0×10^0 분자까지 초고속 PCR의 주형으로 사용하여 검출한계를 측정하였다(Fig. 4).

상기 조건에서 *L. fusiformis* 유전자는 1.0×10^1 분자의 초기 주형에서도 성공적으로 증폭이 가능함을 보여 우수한 민감도를 확인하였다. 10^{-1} 씩 감소시킨 초기분자량 간의 C_T값 차이를 dC_T라 하며, 1.0×10^8 분자에서 1.0×10^1 분자까지의 평균 dC_T값은 약 3.30회전이었고, 1.0×10^1 분자의 초기 주형에서도 평균 C_T값은 36.74 회전이었고, 평균 C_T time은 11분 11초이었고, T_m값 또한 78.47°C로 *L. fusiformis*의 유효범위에 포함되었다. 따라서 안정적인 검출에 필요한 주형의 양은 1.0×10^1 분자 이상이라 판단되었다.

L. fusiformis 특이 유전자 대신 증류수를 넣어준 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR (N; non-template, Fig. 4)은 40 회전 부근에서 C_T line을 넘는 증폭이 관찰되었으나, 이 T_m값은 *L. fusiformis* 유효범위의 T_m과 3.99°C 수준의 차이를 보이는 74.56°C로 측정되어 특이적 증폭이 아님을 쉽게 확인할 수 있었다.

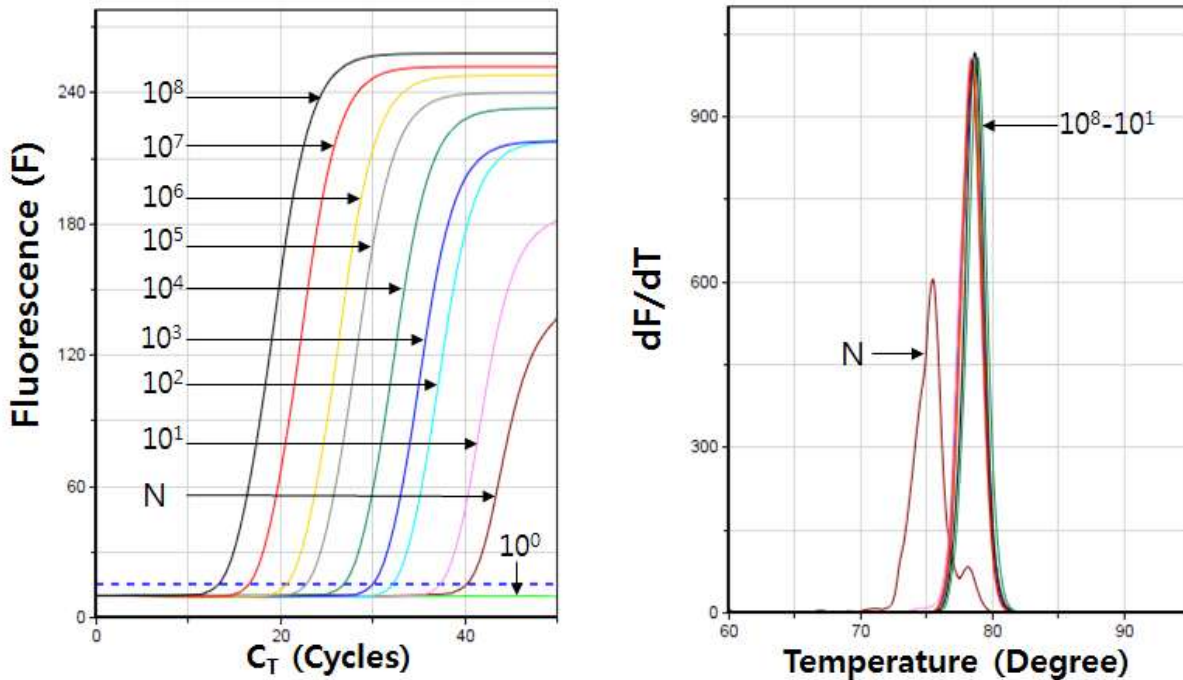


Figure 4. Detection limit of *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid real-time PCR with serial diluted specific DNAs.

The detection limit of *L. fusiformis* gene was estimated using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid real-time PCR under the minimum times of thermocycling (1 sec of denaturation step, 2 sec of annealing step, 2 sec of polymerization step). 1.0×10^1 molecules of pLF-159 was also amplified. Tms of all PCR products were measured as $78.55 \pm 0.73^\circ\text{C}$, except 1.0×10^0 molecule and PCR product using non template.

한편, 재조합 DNA인 pLF-159를 사용한 초고속 PCR에서 연속 희석된 주형 DNA의 양에 따라 각 C_T 값이 측정되었으며, 이에 따른 회귀식(Regression equation)은 $y = -3.1871x + 39.192$ ($y =$ 초기 *L. fusiformis* 의 분자수)로, 이 때 회귀 상수(Regression coefficient)는 $R^2 = 0.9947$ 이었다.

또한, 정확한 정량을 위한 정량 가능 범위는 주형 DNA가 1.0×10^1 분자 이상 1.0×10^8 분자까지라 판단하였으며, 이를 정량가능범위로 정하였다(Fig. 5).

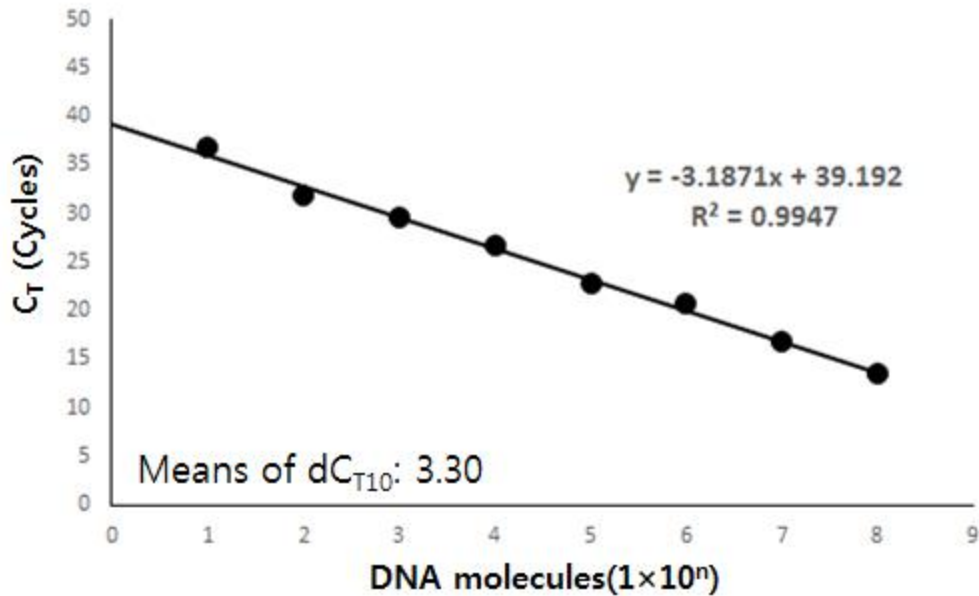


Figure 5. Regression equation based on *L. fusiformis* specific molecules and C_T using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR.

dC_T indicates difference between C_T value (cycles) of PCRs using 10^{-1} serial diluted initial templates.

라. *L. fusiformis* gDNA를 이용한 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR 정량

재조합 DNA pLF-159를 사용하여 구한 정량식(Fig. 5)의 보정을 위하여, *L. fusiformis* 에서 추출한 gDNA를 주형으로, 다양한 초기주형량에 대한 *L. fusiformis* 특이 유전자의 증폭을 측정하였다. *L. fusiformis* 의 1 ml 배양액으로부터 gDNA를 순수분리하여, 이 중 50ng, 25ng, 10ng, 1ng을 *L. fusiformis*-특이 초고속 PCR에 각각 초기 주형으로 사용하였다.

L. fusiformis-특이 초고속 PCR에서 *L. fusiformis* gDNA는 주형으로 정량적 증폭의 패턴을 보였으며, C_T 값은 50ng에서 20.93 회전(C_T time= 6분 22초), 25ng에서 23.45 회전(C_T time= 7분 8초), 10ng에서 26.64 회전(C_T time= 8분 7초), 1ng에서 28.18 회전(C_T time= 8분 35초)으로 측정되었다. 한편, 1.0×10^6 분자의 pLF-159를 사용한 초고속 PCR은 22회전의 C_T 를 나타내어, *L. fusiformis* gDNA양에 따른 목적 유전자의 수 또는 *L. fusiformis* gDNA의 분자수를 계산할 수 있게 하였다(Fig. 6).

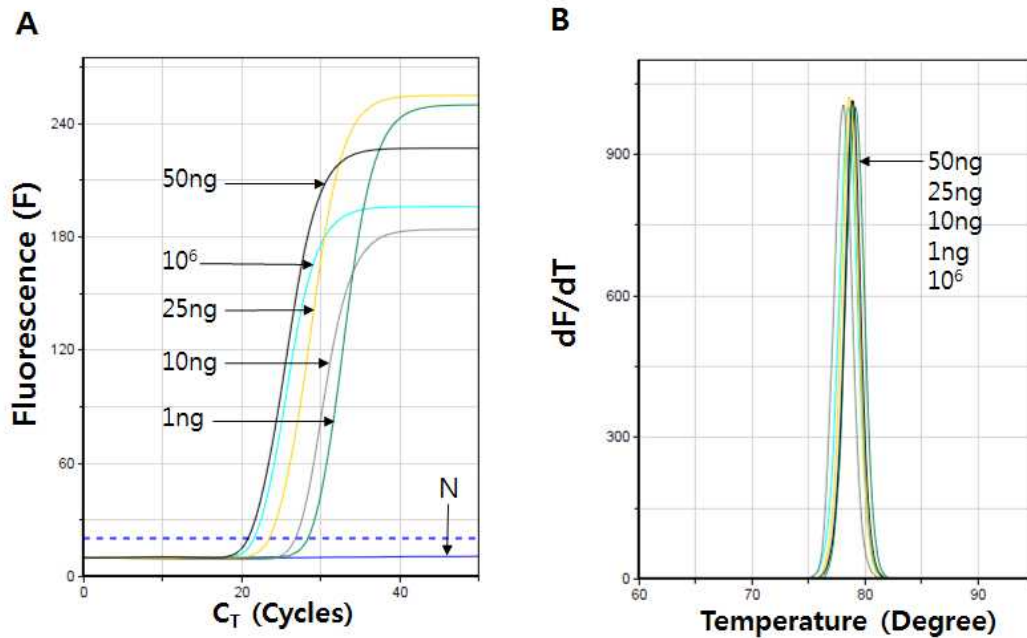


Figure 6. The comparison between gDNA of *L. fusiformis* and target gene on pLF-159.

The Ultra-rapid PCR of *L. fusiformis*-specific gene was performed using 50ng-1ng gDNA of *L. fusiformis* and 1.0×10^6 molecules of pLF-159. Panel A is the fluorescent graph of amplification according to initial gDNA. Panel B is peak graph of T_m value.

마. 국내 판매되는 뒤영벌에서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR을 이용한 *L. fusiformis* 검출

L. fusiformis 특이 초고속 PCR의 유효성을 평가하기 위하여, 국내에서 판매되고 있는 뒤영벌을 수집하여 각 뒤영벌 시료로부터 gDNA를 분리하였으며, 분리된 각 gDNA 50ng을 사용하여 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR을 진행하였다. 사용된 뒤영벌 시료, 즉 수원, 보성, 창원, 청송 각 1개체에서 모두 *L. fusiformis*가 검출되었으며, 특히 창원의 시료의 경우 3곳의 시료에 비해 1000배 이상 많은 *L. fusiformis*가 존재하는 것으로 정량적 계산이 가능하였다 (Fig. 7).

L. fusiformis 특이 초고속 PCR 결과, 모든 시료에서 *L. fusiformis* 특이 유전자 증폭이 관찰되었으며, 각 산물의 용점분석에서 *L. fusiformis* 특이 유전자의 증폭임을 인정할 수 있었다. 측정된 *L. fusiformis*의 T_m 값은 수원(Suwon), 보성(Boseong), 창원(Changwon), 청송(Cheongsong) 각각 78.47°C, 77.82°C, 78.47°C, 78.47°C로, *L. fusiformis*의 양성 증폭의 유효

범위(78.55±0.73℃) 안에 해당함으로 *L. fusiformis* 유전자의 증폭임을 판정할 수 있었다 (Table 2).

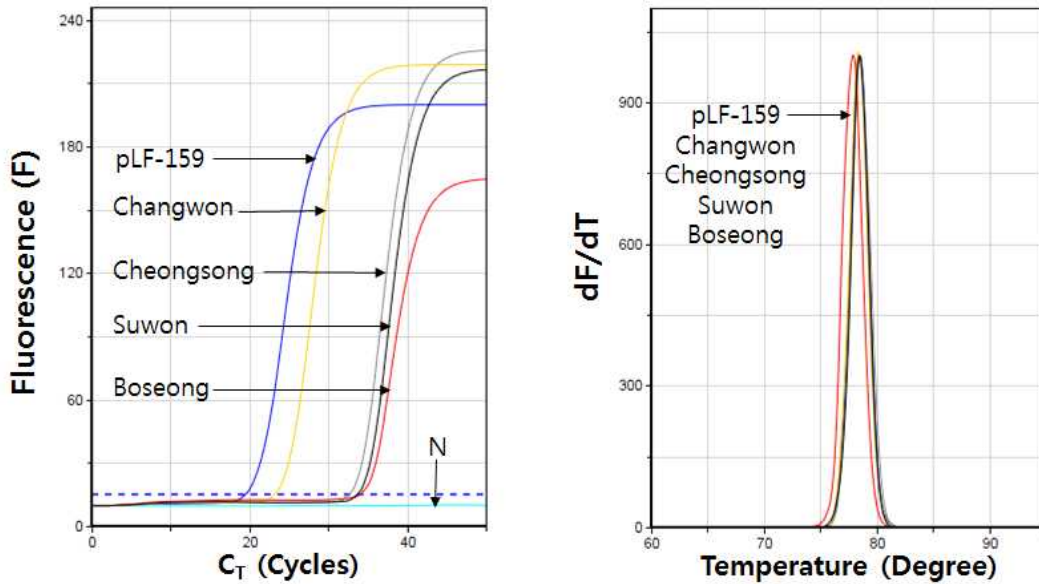


Figure 7. *L. fusiformis*-specific UR-PCR for the detection with commercial bumblebee samples.

UR-PCR was performed with 50ng gDNA from dead bumblebee as initial templates. The PCR condition was 95℃, 15 sec of pre-denaturation, 95℃, 1 sec of denaturation, 57℃, 2 sec of annealing, 72℃, 2 sec of polymerization in each cycle for 50 cycles. *L. fusiformis* specific gene were amplified with commercial bumblebee from Suwon, Boseong, Changwon and Cheongsong.

Table 2. C_T and T_m value of *L. fusiformis*-specific UR-PCR with bumblebee sample

Sample	Negative	Positive	Suwon	Boseong	Changwon	Cheongsong
C _T	-	20.41	34.05	34.53	24.04	33.05
T _m	-	78.47	78.47	77.82	78.47	78.47
Result	-	+	+	+	+	+

이 검출 결과는 *L. fusiformis* 가 국내 판매되고 있는 뒤영벌에 실제로 존재함을 보여주는 것으로, 국내 최초의 보고가 될 것이다. 본 검출에서 사용된 시료는 각 봉군 중 사체를 수집하여 사용하였으며, 평균 무게 70mg의 뒤영벌 성체로부터 평균 7.27µg gDNA를 추출하였

고, 그 중 50ng의 gDNA를 초기 주형으로 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR을 수행한 것이다.

L. fusiformis 가 초기 감염세균으로 뒤영벌에 감염되어 뒤영벌을 치사시킨 것인지, 또는 사체가 된 후에 이차 침입 세균으로 사체에서 단순 성장된 것인지 현재로서 판단하기는 어려울 것이다. 각 사체에 포함되어 있는 *L. fusiformis* 양은 창원, 수원, 보성, 청송의 순서대로 각 1.05×10^8 분자/마리, 7.61×10^4 분자/마리, 5.39×10^4 분자/마리, 1.55×10^5 분자/마리로 계산되었으며, 특히 창원 시료의 경우 *L. fusiformis* 수가 다른 시료에 비하여 1,000배 이상으로 나타나 그 원인이 주목되고 있다. 추후, 본 정량법을 사용하여 *L. fusiformis* 의 뒤영벌에 대한 병원체 여부를 증명하는 연구가 요구된다 할 실험인 것이다.

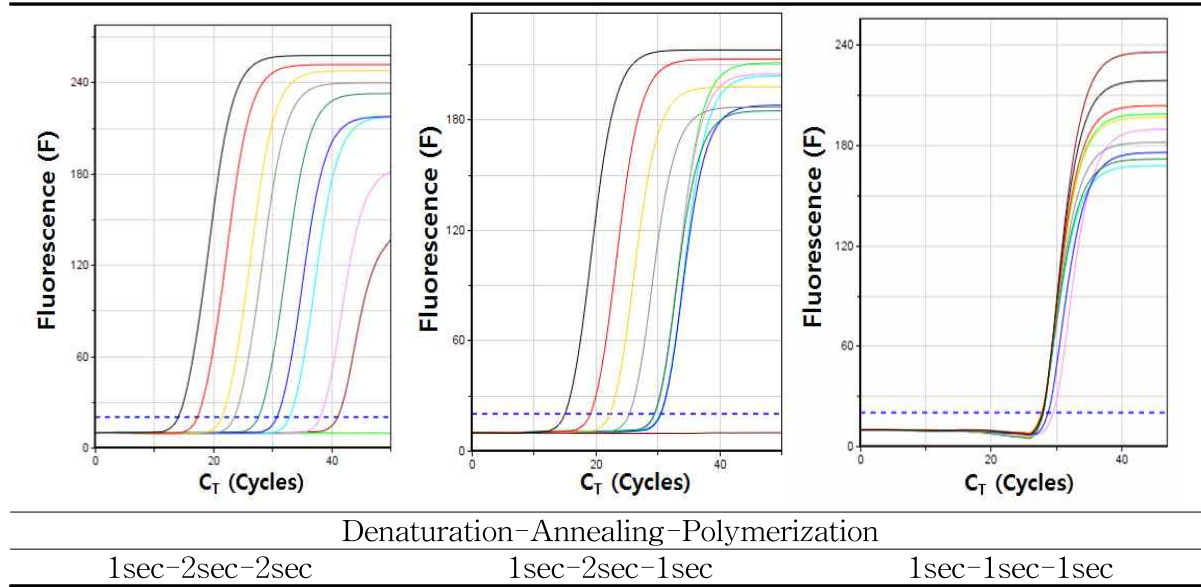
본 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR법을 뒤영벌 사육 현장에서 보다 쉽게 적용하고, 생산과정에서 의 *L. fusiformis* 증감을 모니터링하기 위하여, 성봉 또는 유충으로부터 보다 간소화된 핵산 추출법의 개발이 요구되고 있으며, 이러한 간편 핵산 분리법과 본 초고속 PCR법이 연합될 수 있다면, 바로 현장에서 유전자 검사를 빠르게 수행하여 *L. fusiformis* 의 감염여부를 수 분 내에 판정할 수 있을 것이다. 더 나아가 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR법이 뒤영벌의 다른 병원체에 대하여 현장성을 보인 신속한 검출법 개발로 연구가 확장될 것으로 기대하며, 또한 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준으로 사용되어 *L. fusiformis* 방역에 기여할 것으로 기대하는 바이다.

4. 결론 및 요약

2008년 서양뒤영벌의 급작스런 폐사로 인하여 뒤영벌에 대한 병원체로 그 가능성이 제기된 *Lysinibacillus fusiformis*는 현재까지도 뒤영벌 병원체로서 의심되고 있다. 본 연구에서는 가장 빠르고 간편한 *L. fusiformis* 검출방법을 고안한 것으로, *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR를 개발하여, 뒤영벌 성충으로부터 *L. fusiformis* 검출에 소요되는 시간을 최소화한 것이다. 최적화된 *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 PCR을 적용하였을 때, *L. fusiformis* 의 감염여부는 1.0×10^8 분자수를 기준으로 4분 22초 만에 판정할 수 있었으며, 최소 1.0×10^1 분자의 재조합 DNA까지 정량적으로 측정할 수 있었다. 또한, *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 PCR을 이용하여 국내에서 상업적으로 생산된 뒤영벌을 검사하였으며, 4개 지역에서 각 1개 체씩 실험한 결과, *L. fusiformis* 가 검출됨에 따라, 국내 최초로 뒤영벌에서 *L. fusiformis* 의 존재를 확인할 수 있었다. *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 PCR법은 실험실 내에서 뿐만

아니라 현장에서 정량적 검출을 하기에 유용한 방법이 될 것이며 더 나아가 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준으로 사용되기를 기대한다.

5. Supplement data



Supplement Figure S1. Comparison among fluorescence graphs according to time reduction.

Supplement Table S2. Comparison of C_T, dC_{T10}, and C_T time of SBPV-specific gene according to time reduction.

pLF-159 DNA molecules	Denaturation-Annealing-Polymerization					
	1sec-2sec-2sec			1sec-2sec-1sec		
	C _T	dC _{T10}	C _T time	C _T	dC _{T10}	C _T time
1.0×10 ⁸	14.37	-	4min	15.29	-	4min
			22sec			24sec
1.0×10 ⁷	17.47	3.1	5min	19.24	3.95	5min
			19sec			32sec
1.0×10 ⁶	21.43	3.96	6min	22.27	3.03	6min
			31sec			25sec
1.0×10 ⁵	23.46	2.03	7min	25.29	3.02	7min
			8sec			17sec
1.0×10 ⁴	27.39	3.93	8min	29.18	3.89	8min
			20sec			23sec
1.0×10 ³	30.40	3.01	9min	30.19	1.01	8min
			15sec			41sec
1.0×10 ²	32.47	2.07	9min	30.09	0.1	8min
			53sec			40sec
1.0×10 ¹	37.44	4.97	11min	29.25	0.84	8min
			23sec			25sec
1.0×10 ⁰	-	-	-	-	-	-
Mean of dC _{T10}		3.30			2.26	

6. 특허 출원

본 절의 내용은 대한민국 특허, 출원번호 10-2018-0004043 (접수번호 1-1-2018-0036998-31), 발명의 명칭 “초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 검출방법”으로 2018.01.11. 출원되었음.

제 3 절 초고속 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 이용한 뒤영벌 병원체 *Klebsiella oxytoca*의 신속 검출법 개발

<본 절의 내용은 2018년 3월 Journal of Apiculture에 발표 예정임>

1. 서론

뒤영벌은 화분매개곤충으로 사용되어 시설채소 농법 발달에 큰 영향을 주고 있다.

1994년 처음 국내 약 2,300봉군의 서양 뒤영벌(*Bombus terrestris*)이 수입되기 시작하였으며, 2004년 약 30,000봉군 이상이 수입되었다(윤 등, 2008). 이후 국내 생산이 증가하여 2010년 국내 뒤영벌 수요가 점차 커져 뒤영벌 수출을 생각하고 있다.

선행 연구에서 *A. mellifera*와 *Bombus* species에서 각각 Deformed wing virus (DWV), Black queen cell virus (BQCV), Acute bee paralysis virus (ABPV), Slow bee paralysis virus (SBPV)들을 정량적으로 검출한 바 있었으며(Dino 등, 2015), 서양뒤영벌에서 *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca*를 분리하고, 이들이 새로운 뒤영벌의 병원성 세균일 가능성을 제시하였다(김 등, 2008).

본 연구에서는 서양뒤영벌의 병원체 중 *Klebsiella oxytoca*에 대한 신속 검출법을 개발하고자 하였다. 이에 대한 특이 primer쌍을 새로이 선별 후 제작하여, 뒤영벌 genomic DNA에서 *K.oxytoca*의 존재여부를 한 번의 시험으로 판정할 수 있는 초고속 유전자 검출법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 뒤영벌 시료 확보 및 DNA의 순수분리

본 연구에서 사용된 뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 광주, 경상남도 밀양, 경상남도 창원, 경기도 수원, 전라남도 보성, 경상북도 청송에서 확보된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 사용하였다.

뒤영벌의 genomic DNA (gDNA)의 분리는 G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)을 사용하여 뒤영벌 1마리로부터 분리하였다. 추출된 total gDNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70 °C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

나. 재조합 DNA 확보

뒤영벌 병원체로 의심되는 *K. oxytoca*는 ATCC 1686을 입수하여 배양하였고, gDNA를 추출하여 diol dehydratase-reactivating factor 유전자의 부분을 PCR 증폭하고, pBX-vector에 클론화하여 표준기질로 사용하였다. 제작된 *K. oxytoca* 특이 재조합 DNA는 pBX-K.oxytoca208이라 명명하였고, 이는 GenBank AF017781의 2,065-2,272염기(길이 208염기)를 탑재하고 있다.

다. *K. oxytoca* 특이 primer 설계 및 제작

Table 1. Information of *K. oxytoca* specific primer set

Pathogens	Name of primer	Sequence (5' → 3')	PCR product size (bp)
<i>K.oxytoca</i>	K.oxytoca-DC-F1	ATGAACGGTAATCACAGCGCC	145
	K.oxytoca-DC-R1	TGTCCACGACCTCTCCG	

K. oxytoca 특이 primer 쌍은 GenBank number AF017781의 2,063-2,207염기 부분인 diol dehydratase-reactivating factor 유전자의 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 primer이며, 각각 21,17mer의 길이로 설계되었으며, 이 primer들은 Bionics사(Korea)에 의뢰하여 제작하였다(Table. 1).

라. *K. oxytoca* 특이 primer 쌍의 최적 혼성 온도 측정

K. oxytoca 특이 primer의 최적화를 수행하였다. 최적화는 primer의 최적 혼성 온도 및 최적 농도를 측정하였다. 최적 혼성 온도를 측정하고자 온도구배 실시간 PCR (Temperature-gradient real-time PCR)을 수행하였다. 1.0×10^4 분자 수 재조합 DNA를 주형으로 사용하여 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)로 수행하였다. 각 단계의 온도조건은 95 °C 초기 변성 3분 후, 95 °C 변성 10초, 42 ~ 62 °C 혼성 10초, 72 °C 중합 10초의 조건으로 40 cycle 후, PCR 산물의 용점온도(melting temperature) 분석은 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다. 각 혼성 온도에 따른 C_T (threshold cycle)값 및 산물의 최종 형광 값의 비교 분석을 통해 최적 혼성 온도를 설정하였다.

마. primer 쌍의 용접 분석 및 검출한계 측정

PCR 산물의 용접 분석을 통해 특이적 증폭과 비특이적 증폭을 확인하였다. 용접 분석은 T_m (Temperature of mid-point)으로 나타내었으며, 특이 또는 비특이 산물의 T_m 값의 차이를 통해 구분할 수 있었다.

검출한계를 측정하고자, 재조합 DNA를 1×10^8 분자부터 1×10^0 분자까지 10배씩 연속 희석하여 각 PCR에서 주형 DNA로 사용하였다. PCR은 Genechecker (GeneSystem, Korea)을 사용하였으며, 조건은 95 °C 초기 변성 30초 후, 95 °C 변성 4초, 59 °C 혼성 4초, 72 °C 중합 4초의 조건으로 50 cycle 진행하였다.

바. 서양 뒤영벌 검체에서의 병원체 검출 및 판정

경기도 광주, 경상남도 밀양, 경상남도 창원, 경기도 수원, 전라남도 보성, 경상북도 청송에서 생산된 뒤영벌 1마리로부터 각각 gDNA를 분리하였다. 분리된 gDNA 50 ng을 사용하여 *K. oxytoca* 특이 초고속 검출을 수행하였다. 다중 실시간 PCR은 Genechecker (GeneSystem, Korea)를 사용하였으며, PCR 조건은 95 °C 초기 변성 30초 후, 95 °C 변성 4초, 59 °C 혼성 4초, 72 °C 중합 4초의 조건으로 40 cycle을 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *K. oxytoca* 특이 primer 쌍의 최적 혼성 온도 측정

최적 혼성 온도를 측정하기 위하여 재조합 DNA를 주형으로 사용하였다. 혼성 온도는 42 ~ 62 °C에서 각기 다르게 진행하였으며, 반응 후 C_T 값 및 최종 형광값을 비교 분석하여 최적 혼성 온도를 확인하였다. *K. oxytoca* 특이 primer 쌍의 최적 혼성 온도는 59 °C에서 가장 빠른 C_T 값과 높은 최종 형광값이 확인되어, 59 °C를 최적 혼성 온도로 하여 이후 실험에서 사용되었다.

나. primer 쌍의 융점 분석 및 검출한계 측정

검출한계를 측정하고자, 재조합 DNA를 1×10^8 분자부터 1×10^0 분자까지 10배씩 연속 희석하여 각 PCR에서 주형 DNA로 사용하였다. 조건은 95 °C 초기 변성 30초 후, 95 °C 변성 4초, 59 °C 혼성 4초, 72 °C 중합 4초의 조건으로 50 cycle 진행하였다.

위에 조건에서 *K. oxytoca* 특이 유전자는 1×10^2 분자의 초기 주형까지 증폭 가능함을 보였다. 이때 증폭은 1×10^1 분자의 초기 주형에서도 가능 하였지만, 융점의 분석을 통해 증폭이 특이적인지를 확인하였다. 특이적인 검출에서의 융점은 89.03 °C로 확인되었고, 비특이적인 검출에서는 75.56 °C로 크게 다른 융점을 통해 유전자의 유무를 확인할 수 있었다 (Figure. 1).

1×10^8 분자 수의 특이 유전자는 17.55 회전 만에 검출 가능하였고, 이 때 걸린 시간(C_T time)은 7분 36초이었다. 총 걸린 시간은 22분 14초였다.

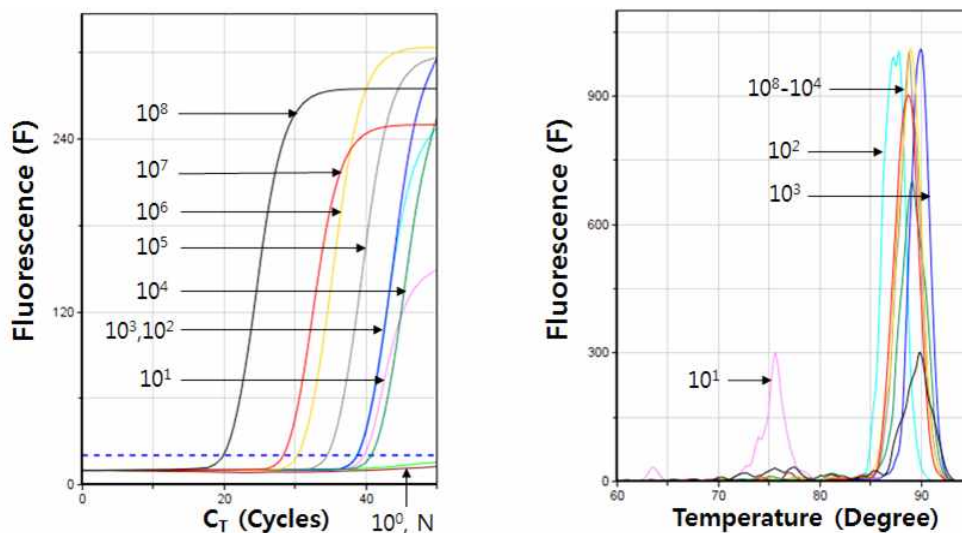


Figure 1. Detection limit of *K.oxytoca*-specific Ultra-Rapid PCR with diluted specific DNA.

The detection limit was estimated using *k.oxytoca*-specific Ultra-Rapid PCR under the optimum times (4 sec of denaturation step, 4 sec of annealing, 4 sec of polymerization). *K.oxytoca* gene was detected up to 1.0×10^2 molecules. T_m of *k.oxytoca*-specific PCR products were measured as 89.03 °C, non-specific PCR product were measured as 75.56 °C.

다. 서양 뉘영벌 검체에서의 병원체 검출 및 판정

경기도 광주, 경상남도 밀양, 경상남도 창원, 경기도 수원, 전라남도 보성, 경상북도 청송에서 생산된 뉘영벌 1마리로부터 각각 gDNA를 사용하여 *K.oxytoca* 특이 초고속 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95 °C 초기 변성 30초 후, 95 °C 변성 4초, 59 °C 혼성 4초, 72 °C 중합 4초의 조건으로 40 cycle을 진행하였다. 양성 대조군으로서 재조합 DNA 1 x 10⁸ 분자 수를 주형으로 함께 반응하였다.

각각의 뉘영벌에서 분리된 gDNA에서 *K. oxytoca* 특이 유전자의 유무는 용점분석을 통해 판정하였다. 함께 반응한 양성 대조군의 용점을 기준으로 하여 양성은 88.40 °C 부근으로 판정하였다. 그러나 6 지역의 뉘영벌 gDNA에서는 모두 양성 용점 값에서 벗어난 값이 측정되었고, 이에 음성 검체로 판정하였다. 각 PCR 산물의 용점은 83.11 °C(광주), 83.77 °C(밀양), 80.14 °C(창원), 83.44 °C(수원), 83.77 °C(보성), 0.00 °C(청송)으로 측정되어 모든 시료에서 음성반응을 확인하였다.

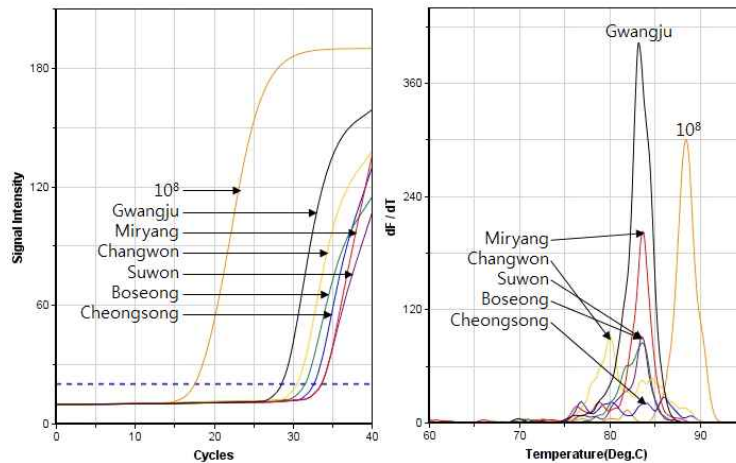


Figure 2. Detection of *K.oxytoca*-specific Ultra-Rapid PCR with gDNA of *Bombus terrestris* from each area.

The gDNA of *Bombus terrestris* was isolated from each area, Gwangju, Mirayng, Changwon, Suwon, Boseong and Cheongsong. Extracted gDNA 50 ng was used to *K.oxytoca*-specific Ultra-rapid PCR as templates. The presence of the *K. oxytoca* specific gene in the gDNA isolated from each *Bombus terrestris* was determined by melting point analysis. Based on the melting point of the positive control group that was reacted together, the positive was determined to be around 88.40 °C.

However, all of the gDNAs in the subspecies of six regions were deviating from the positive melting point values and were judged to be negative samples. The melting point of each PCR product was measured as 83.11 °C(Gwangju), 83.77 °C(Milyang), 80.14 °C (Changwon), 83.44 °C(Suwon), 83.77 °C(Boseong) and 0.00 °C(Cheongsong).

4. 결론 및 요약

Klebsiella oxytoca (*K. oxytoca*)는 뒤영벌의 병원체로 알려져 있으며, 이들은 서양뒤영벌에 감염을 일으켜 급작스런 폐사의 원인이 된다. 본 연구는, 뒤영벌에서 빠르게 *K.oxytoca*를 검출하고자 *K. oxytoca* 특이 초고속 PCR법을 개발한 것을 보고하고자 한다.

K. oxytoca 특이 초고속 PCR은 최적 조건하에 1.0×10^8 분자의 *K. oxytoca* 특이 유전자의 존재를 7분 36초 만에 검출할 수 있었으며, 최소 1.0×10^2 분자의 특이 재조합 DNA까지 검출 가능함을 확인하였다. 국내 생산된 뒤영벌 시료들을 사용하여 *K. oxytoca* 특이 초고속 PCR을 수행하였으며, 국내 총 6종에서 검사하였으며, 검사 판별은 반응 종료 후 T_m 값의 분석을 통해 수행하였으며, 6종 모두에서 *K. oxytoca*의 특이 유전자가 검출되지 않음을 확인하였다. 이는 재조합 DNA 상의 *K. oxytoca* 특이 유전자 염기서열과 다른 부분에서 증폭되었음을 보였고, 그에 따라 T_m 값에서 차이가 남을 확인하여 감염이 되지 않았음을 확인하였다.

K. oxytoca 특이 유전자 초고속 PCR법은 실험실 내 뿐만 아니라 현장에서 직접 검출하기에 유용한 방법이라 사료되며 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준에 사용되어 발병 방지에 기여하기를 기대한다.

5. 특허 출원

본 절의 내용은 대한민국 특허, 출원번호 10-2017-0183625 (접수번호 1-1-2017-1309698-64), 발명의 명칭 “뒤영벌 병원체 클레브시엘라 옥시토카 검출용 PCR 프라이머 및 이를 이용한 초고속 검출방법” 으로 2017.12.29. 출원되었음.

제 4 절 뒤영벌 병원체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 32(2): 99-109 (2017)에 Development of real-time PCR Detections against 11 Pathogens of *Bombus* Species의 제목으로 발표된 것임>

1. 서 론

화분매개곤충의 이용은 시설채소 농법의 발달에 큰 영향을 주었으며, 꿀벌(*Apis mellifera*) 그리고 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)이 주요 화분매개 곤충으로 사용되고 있다. 뒤영벌에 대한 실용화 연구는 유럽을 비롯하여 미국, 캐나다에서 이미 활발하게 이루어져 상품화 되었으며, 일본, 중국, 대만 그리고 한국 등은 화분매개용으로 뒤영벌을 수입하여 사용하고 있다 (de Ruijter *et al.*, 1997; Dafni *et al.*, 1998; Masahiro *et al.*, 2000; Velthuis and Van Doorn, 2006). 국내의 경우, 시설재배 면적이 증가하면서 1994년에 처음 2,300봉군의 서양뒤영벌 (*Bombus terrestris*)이 수입되기 시작하였으며, 2004년에는 약 30,000봉군 이상이 수입된 바 있었으나(윤 등, 2008), 이후 뒤영벌의 국내 생산은 크게 증가하여, 2010년 이래 국내 뒤영벌 수요를 넘어서면서 새로이 뒤영벌 수출의 길을 모색하고 있다.

Dino 등(2015)은 *A. mellifera*와 *Bombus species*에서 각각 Deformed wing virus (DWV), Black queen cell virus (BQCV), Acute bee paralysis virus (ABPV), Slow bee paralysis virus (SBPV)들을 정량적으로 검출한 바 있었으며, 특히 *A. mellifera*에는 DWV의 발병률이 높은 것을, *Bombus species* 중 일부에서 SBPV의 발병률이 높음을 보여 주었다. 한편, 국내의 연구로 최 등(2009)은 꿀벌의 바이러스인 DWV가 서양뒤영벌과 호박벌에도 존재함을 처음으로 확인하였고, 이어서 서양뒤영벌에서 7종의 꿀벌바이러스, 즉 DWV, BQCV, Israeli acute paralysis virus (IAPV), Cloudy wing virus (CWV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Sacbrood virus (SBV), Kashmir bee virus (KBV)들이 존재함을 확인한 바 있었다 (최 등, 2010). 또한 김 등(2008)은 서양뒤영벌에서 *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca*를 분리하고, 이들이 새로운 뒤영벌의 병원성 세균일 가능성을 제시하였다.

꿀벌 병원체 검색법의 경우, American foulbrood disease (AFB)의 원인균인 *Paenibacillus larvae* 그리고 주요 병원성 바이러스들, 즉 IAPV, CBPV, korean Sacbrood Virus (kSBV) 등에 대하여, 해당 병원체의 존재를 빠르게 확인하는 방법으로 초고속 실시간 PCR법을 개발 되었으며 (유 등, 2009; 유 등, 2010; Han *et al.*, 2011), 꿀벌 주요 병원체의 종합적 검출을 위한 DNA-chip도 개발된 바 있으나(Wang *et al.*, 2016), 뒤영벌을 검사대상으로 하여 다양

한 병원체를 동시에 검사할 수 있는 검출법은 제시된 바 없었다. 또한 근래에 대두되고 있는 국내 뒤영벌의 수출 추진에서도, 뒤영벌의 검역기준은 국내외로 정립된 바가 매우 미약한 수준이기에, 이를 명확하게 정립하기 위하여 뒤영벌 수출입을 위한 병원체 검사법, 또는 검역 기준은 매우 긴급하다 할 것이다.

본 연구에서는 서양뒤영벌의 병원체들에 대한 표준검사법을 개발하고자 하였으며, 이를 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준으로 제시하고자 하였다. 검출대상 병원체들은 꿀벌 및 뒤영벌에서 교차 감염을 야기하는 8종의 병원체, 즉 BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, kSBV, *P. larvae*, *Mellisococcus plutonius*와 뒤영벌 특이 병원체(후보) 3종, 즉 SBPV, *L. fusiformis*, *K. oxytoca*를 선별하였으며, 이들에 대한 특이 primer쌍을 새로이 제작 또는 선별하여, 병원체 총 11종의 존재여부를 한 번의 시험으로 판정할 수 있는 초고속 유전자 검출법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료의 확보 및 DNA와 RNA의 분리

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원에서 확보된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 사용하였다.

Genomic DNA (gDNA)의 분리는 G-spin™ Total DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)의 시행방법을 따랐으며, 약술하면, 뒤영벌 시료 1마리를 2.0 ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합 후, MagNa Lyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 300 μ l lysis buffer를 넣고 15초 vortexing하여 혼합하였으며, 500 μ l binding buffer를 추가로 넣어 완전히 혼합한 후, 전용 column에 loading하였다. 이를 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후, collection tube에 나온 용액을 제거하였고, column에 500 μ l의 washing buffer를 넣고, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 세척하였다. 이후 column을 1.5 ml 원심분리관으로 옮기고, 60 μ l의 증류수를 column에 넣어 부착된 gDNA를 용출시키고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리로 DNA 용액을 수집하였다. 추출된 total gDNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70 °C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

Total RNA 분리는 R&A Blue Kit (Takara, Japan)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 약술하면, 뒤영벌 시료 1마리를 2.0 ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합한 후 1.0 ml R&A Blue 시약을 넣고 MagNa Lyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 200 μ l chloroform을 넣고 15초간 vortexing 하여 혼합하였으며, 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 rpm 10분간 원심 분리하여, 상등액만을 1.5 ml tube에 옮겼다. 시료 상등액과 같은 부피의 isopropyl alcohol을 넣고 15초간 vortexing하여 혼합하였으며, 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 rpm, 10분간 원심 분리하고 상등액을 제거하였다. RNA 침전물은 0 $^{\circ}$ C로 준비한 75% ethanol을 사용하여 washing 과정 진행한 후, DEPC 처리된 증류수를 사용하여 total RNA의 용액으로 확보하였다. 추출된 total RNA는 spectrophotometer로 정량하였고 -70 $^{\circ}$ C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

나. 뒤영벌 특이 primer들의 제작 및 재조합 plasmid DNA 확보

뒤영벌 병원체 11종에 대하여 GenBank (NCBI)에서 염기서열 정보를 확인한 후 각각 한 쌍의 특이 primer들을 설계 하였고, 해당 PCR 산물의 길이는 정량 초고속 PCR에 적합하도록 120 bp부터 250 bp 사이가 되도록 설계하였다. 각 검출용 primer들은 설계대로 전문회사 (Bionics, Korea)에 의뢰하여 제조하였다(Table 3).

뒤영벌 병원체로 의심되는 *L. fusiformis*는 ATCC 3454를 입수하여 배양하였고, genomic DNA를 추출하여 Glutamyl-tRNA amidotransferase 유전자의 부분을 PCR 증폭하고, pBX-vector에 클론화하여 표준기질로 사용하였다. 제작된 *L. fusiformis* 특이 재조합 DNA는 pBX-L.fusiformis 159라 명명하였고, 이는 GenBank CP010820.1 (*L. fusiformis* full genome)의 4568067-4568195염기(길이 159염기)를 탑재하고 있다(Table 1).

Table 1. Oligonucleotides for the amplification of *L.fusiformis*-specific DNA

Target*	Primer	Sequence (5'→3')
Glutamyl tRNA	L.fusiformis detection F	GACTGTGGTTGAAAAGCTACGTG
amidotransferase	L.fusiformis detection R	GAGCCTCCACTTGAACCACC

* target DNA is located in GenBank CP010820.1 (4568067-4568195; 159 bp long)

또한, *K. oxytoca*는 ATCC 1686을 입수하여 배양하였고, genomic DNA를 추출하여 diol dehydratase-reactivating factor 유전자의 부분을 PCR 증폭하고, pBX-vector에 클론화하여 표준기질로 사용하였다. 제작된 *K. oxytoca* 특이 재조합 DNA는 pBX-K.oxytoca208이라 명명하였고, 이는 GenBank AF017781의 2,065-2,272염기(길이 208염기)를 탑재하고 있다(Table 3).

한편, Slow bee paralysis virus (SBPV)의 경우, GenBank EU035616의 염기서열을 기준으로 330 특이 염기서열들을 설계하였으며, 이 염기서열의 제작에 필요한 long-nucleotide들은 전문회사(Bionics, Korea)에 의뢰하여 공급받았고, 혼합 신장 및 각 말단 primer에 의한 PCR로 합성 제조하였다. 증폭된 330염기의 PCR산물은 pBX-vector에 클론화하여 표준기질로 사용하였으며, 제작된 SBPV 특이 재조합 DNA는 pBX-SBPV-C3G이라 명명하였다. 이는 GenBank EU035616의 7,190-7,519염기(길이 330염기)를 탑재하고 있다(Table 2).

Table 2. Long-nucleotides for the artificial synthesis of SBPV-specific DNA

pathogen	Name of Long nucleotides	sequence(5'->3')
SBPV	SBPV-C3G-F4	AGTAATATAGCATTAAATTAAGTTACCGAAACATGTGCCTATGTTTAAGGATATT
	SBPV-C3G-F3	TATGTTTAAGGATATTAGCAAGAGTATTGTTACGCAGGGTGATCATGCTAATGT
	SBPV-C3G-F2	TGATCATGCTAATGTCGGCCATTTCTGTTCTATAGTATCACAACAATATGATGA
	SBPV-C3G-F1	ACAACAATATGATGAGCATCCAGTTGTTTCGTTCTCAGGTACCTGTTACATGGAA
	SBPV-C3G-R1	TGTTCAACATGGCGATCACCAGCTATAACCAAATGCTGTTTCCATGTAACAGGT
	SBPV-C3G-R2	CCCTCGCACGTTATATTCATAACATTTATCCATTATTATCTGTTCAACATGGCGA
	SBPV-C3G-R3	AAACACCCGGACTAACGAGCGCACTCCCGCACATGCCAAACCCCTCGCACGTTATA
	SBPV-C3G-R4	ACCAGCAACATGCAGCCCTATAACGCCGCCGTTTCCACAGCAAACCCCGGACTA

* target DNA is located in GenBank EU035616 (7190-7519; 330 bp long)

다. 실시간 PCR 최적 조건 확립을 위한 온도 구배 실시간 PCR

뒤영벌 병원체 11종에 대한 각 primer 쌍의 PCR 조건에서 최적 annealing 온도 조건을 찾기 위해 온도구배 실시간 PCR (Temperature-gradient real-time PCR)을 수행하였다. 실시간 PCR은 2x fast RT-PCR premix (Nanohelix, Korea)를 사용하였고, 최종농도 각 0.5 μM forward/reverse primer, 각 1.0 x 10⁴ 분자 수의 DNA가 주형으로 사용되었으며 총 20 μl

Table 3. Primer sets for the specific detections of pathogens in *Bombus* species

Pathogens	Name of primers	Sequence (5' to 3')	PCR amplicon size (bp)
BQCV	BQ-DC-F1	ACTTTGAAGGTTTCGACGCTTCGG	233
	BQ-DC-R1	GACGGAATTTATAATAGCAGTGAGAT	
CBPV	CB-DC-F1	CCGACACATACTTCACTCTCTCAT	230
	CB-DC-R1	GTACTTGCGGCGAGGTTCTG	
DWV	DW-DC-F1	ACTATAAGAATTTTGGTCCTGGGT	223
	DW-DC-R1	ATGTCCGTTATCGGAGAACCTGA	
IAPV	KBIA-DC-F1	ATTTTTCAACTTTTGATGGATCAC	213
	IA-DC-R2	AATTGAGCGGGGTCGTTGCA	
SBV	SB-DC-F1	AGTGGGGATGAAATTACTAG	236
	SB-DC-R1	CGCACATAATGCCTCGGTAATA	
kSBV*	kSBV-RPA F	CTTACGCTAAGTGC GCGCCCAATACTATAC	121
	kSBV-RPA R	GAAACAATAACTTTCCCGCACTGAAACTTA	
<i>P. larvae</i>	AFB-DC-F1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA	243
	AFB-DC-R1	TCCTCTCTACTCAAGTCTCC	
<i>M. plutonius</i>	EF-DC-F1	AAGAGTAACTGTTTTCTCTCG	208
	EF-DC-R1	TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	
<i>L. fusiformis</i>	L. fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGTATTTTCAC	129
	L. fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCTTATC	
<i>K. oxytoca</i>	Klebsiella-F	GAACGGTAATCACAGCGCC	208
	Klebsiella-R	CAGCATATGGCGGTCCG	
SBPV	SBPV-F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224
	SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA	
β -actin**	β -actin 151 F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	151
	β -actin 151 R	GACCCACCAATCCATACGGA	

* Min *et al.*, 2016.

** Yang and Cox-Foster, 2005

volume으로 수행하였다. 실시간 PCR은 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)로 수행하였고, PCR 조건은 94 °C, 3분간 pre-denaturation 진행한 후, 94 °C, 10초간 denaturation, 42 ~ 62 °C의 온도구배에 10초간 annealing, 72 °C, 10초간 extension의 조건으로 40 cycle을 진행하였다. PCR 산물의 용점온도(melting temperature) 분석은 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다. 뒤영벌 병원체 11종에 대한 각 최적 온도 조건 결과에서 Ct (threshold cycle) 그래프의 최종 형광 값 및 PCR 산물의 밀도를 측정하여 최적 조건을 확인하였고, 이들 자료는 그래프로 나타내었다.

라. 병원체 검역을 위한 뒤영벌 gDNA 적정 사용량

뒤영벌 병원체 각 11종에 대하여 1×10^6 부터 1×10^0 분자 수의 재조합 plasmid DNA를 주형 DNA로 하여, 이들을 서양 뒤영벌 gDNA 50 ng이 포함된 것과 포함되지 않은 것을 실시간 PCR로 함께 또는 각각 수행하여 비교하였다. Real-time PCR 조건은 94 °C, 3분간 pre-denaturation 진행하였고, 94 °C, 10초간 denaturation, 53.7 °C, 10초간 annealing, 72 °C, 10초간 extension의 조건으로 40 cycle 진행하였다. PCR 산물의 용점 온도 분석은 60 °C에서 90 °C까지 1초 간격으로 1 °C씩 증가시키며 형광 값을 측정하여 그래프로 나타내었고, 그래프를 미분화하여 peak 그래프를 확인하였다.

마. 뒤영벌 병원체 특이 검출을 위한 각 primer 쌍의 용점 분석 및 검출 한계 측정

뒤영벌 병원체 각 11종에 대하여 각각 실시간 PCR 반응 후 증폭산물의 용점온도 분석을 실시하였다. 이 용점온도 분석도 60 °C부터 90 °C까지 1초 간격으로 1 °C씩 증가하며 형광 값을 측정하여 그래프로 나타내었고, 그래프를 미분화하여 온도변화의 최고점을 확인하였다. 이 최고점은 Tm (Temperature of mid-point)와 같은 의미이며, 이들을 각각의 PCR 산물에 대한 Tm으로 제시하였다. 표준 기질에 대한 PCR 산물의 Tm값을 기준으로 비특이적 반응 산물을 구분할 수 있었다.

검출 한계 측정을 위하여, 뒤영벌 병원체 각 11종의 특이 유전자에 대한 재조합 plasmid DNA들을 spectrophotometer로 260 nm의 흡광도에서 정밀 정량 측정하여, 각 DNA용액 중 표준기질 분자의 수를 계산하였다. 각 재조합 plasmid DNA는 1×10^6 분자부터 1×10^0 분자까지 10배씩 연속 희석하여 각 PCR에서 주형 DNA로 사용하였다. 연속 희석된 주형 DNA와 각 PCR에서 primer의 각 최종농도는 0.5 μ M이 되도록 하였으며, 2x fast RT-PCR

premix (Nanohelix, Korea)를 사용하여 뒤영벌 병원체 특이 PCR의 검출한계를 측정하였다. 실시간 PCR의 반응액 조성 중 서양뒤영벌의 50 ng gDNA를 추가하여 이하의 PCR 반응들을 수행하였다. Real-time PCR은 Genechecker™ (Gene System Co., Korea)을 사용하였으며, 조건은 94 °C, 1분 pre-denaturation을 진행하였고, 94 °C, 10초 denaturation, 54 °C, 10초 annealing, 72 °C, 10초 extension 의 조건으로 40 cycle 진행하였다.

바. 서양뒤영벌 검체에서 다중 실시간 PCR로 감염된 병원체 검출 및 판정

국내에 유통되고 있는 서양뒤영벌 시료의 병원체 감염여부를 판단하기 위하여, 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원에서 생산된 뒤영벌 각 1마리에 대하여 gDNA와 total RNA를 분리하였다. Total RNA 중 1 µg을 complementary DNA (cDNA)로 합성하여 virus에 대한 검출을 시도하였고, gDNA, cDNA는 각 50 ng을 사용하여 뒤영벌 병원체 BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, kSBV, SBPV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *L. fusiformis*, *K. oxytoca* 등 11종에 대하여 다중 실시간 PCR (multiple real-time PCR)을 수행하였다. 각 뒤영벌 병원체에 대하여 각 0.5 µM primer 쌍 (각 최종농도)이 사용되었으며, 총 20 µl volume으로 수행하였다. 다중 실시간 PCR은 Genechecker™ (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, PCR 조건은 94 °C, 3분 pre-denaturation 후, 94 °C, 10초 denaturation, 54 °C, 10초 annealing, 72 °C, 10초 extension의 조건으로 40 cycle을 진행하였으며, PCR 증폭산물의 융점분석은 70 °C에서 90 °C까지 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 뒤영벌 시료의 확보 및 DNA와 RNA의 분리

뒤영벌 성체 1마리는 무게가 70 mg내외로 측정되었으며, 여기서 추출된 gDNA는 농도가 평균 114 ng/µl 수준이었으며, 뒤영벌 1마리 당 평균 5.7 µg의 DNA를 얻을 수 있었다. 한편 뒤영벌 성체(평균 70 mg)로부터 추출된 total RNA는 평균 농도가 2.0 µg/µl 수준이었으며, 평균 약 98 µg을 얻을 수 있었다. cDNA의 제작은 2.0 µg total RNA를 사용하여, 역전사 반응을 실시하였으며, 얻어진 20 µl cDNA 중 1 µl를 주형 DNA으로 사용하여 DNA 병원체와 같이 PCR에서 주형으로 사용하였다.

나. 뒤영벌 병원체에 대한 특이 primer쌍 선발 및 표준 DNA

각 primer의 설계는 Genbank (NCBI)에 등록된 해당유전자를 확인하고 특이성이 높은 것들을 선발 또는 재설계하였고, 그 특이성, 민감성, 정확성, annealing 온도 적합성을 기준으로 선발하였다(Table 3).

모든 병원균과 바이러스들의 통일된 PCR 검출조건을 알아내기 위하여, 각기 클론화된 표준 기질(standard template)이 필요하였으며, 결국 국내외로 감염체 확보가 특히 어려운 SBPV (Genbank, Accession No. EU035616)는 peptidase-c3 like 유전자에서, *L. fusiformis* (Genbank, Accession No. CP010820.1)는 Glutamyl-tRNA amidotranferase 유전자에서, *K. oxytoca* (Genbank, Accession No. AF017781)는 diol dehydratase-reactivating factor 유전자에서 각기 특이 유전자부위를 인공합성 또는 PCR 증폭물의 클론화를 통하여 확보할 수 있었다.

다. *Bombus* pathogen specific Real-time PCR의 최적 혼성 온도

뒤영벌의 11종 병원체 검출을 위한 primer쌍들을 사용한 최적 PCR 조건들을 확립하고자, 각각의 primer쌍을 사용한 PCR에서 최적 annealing 온도를 구하였다. 실시간 PCR들의 결과에서, BQCV, DWV, SBV, SBPV, *M. plutonius*, *L. fusiformis*와 *K. oxytoca*의 경우는 각 특이 유전자가 42 °C ~ 62 °C annealing 온도범위에서 최고량의 PCR 증폭산물을 만드는 것이 관찰되었으며, CBPV, IAPV, kSBV와 *P. larvae*들은 48 °C ~ 58 °C annealing 온도에서 특이 PCR 증폭이 유효한 것으로 나타났다.

또한, 최적의 annealing 온도 조건은 각기 45 °C (SBV), 52 °C (SBPV) 53 °C (BQCV, *M. plutonius*, *K. oxytoca*), 54 °C (CBPV, IAPV, kSBV, *P. larvae*), 56 °C (*L. fusiformis*), 57 °C (DWV)로 다양히 측정되었으나, 하나의 조건에서 11종 병원체 검출을 위한 PCR의 annealing 온도는 53.2 °C로 통합하였다. 각 annealing 온도의 허용범위와 함께 각 최적 온도는 세로선과 점으로 나타내었다(Figure. 1).

이들 각 병원체에 대한 최적 annealing 온도는 개별 실시간 PCR에서 보다 유리할 수 있을 것이나, 본 연구의 목적인 11종 모두의 다중 실시간 PCR의 수행에 있어, 11종에 대한 PCR 모두가 단일 annealing 온도로 수행될 수 있다면 다수의 시료에 대한 검사를 수행할 경우 보다 유리할 것이다. 따라서, 각각의 표준 유전자 주형에서 동일한 수준의 분자 수(10^5 copies)를 사용한 실시간 PCR을 수행하였으며, 이의 Ct 값 분포를 고려하고 각 primer의

Table 3. Primer sets for the specific detections of pathogens in *Bombus* species

Pathogens	Name of primers	Sequence (5' to 3')	PCR amplicon size (bp)
BQCV	BQ-DC-F1	ACTTTGAAGGTTTCGACGCTTCGG	233
	BQ-DC-R1	GACGGAATTTATAATAGCAGTGAGAT	
CBPV	CB-DC-F1	CCGACACATACTTCACTCTCTCAT	230
	CB-DC-R1	GTACTTGCGGCGAGGTTCTG	
DWV	DW-DC-F1	ACTATAAGAATTTTGGTCCTGGGT	223
	DW-DC-R1	ATGTCCGTTATCGGAGAACCTGA	
IAPV	KBIA-DC-F1	ATTTTTCAACTTTTGATGGATCAC	213
	IA-DC-R2	AATTGAGCGGGGTCGTTGCA	
SBV	SB-DC-F1	AGTGGGGATGAAATTACTION	236
	SB-DC-R1	CGCACATAATGCCTCGGTAATA	
kSBV*	kSBV-RPA F	CTTACGCTAAGTGC GCGCCCAACTATAC	121
	kSBV-RPA R	GAAACAATAACTTTCCCGCACTGAACTTA	
<i>P. larvae</i>	AFB-DC-F1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA	243
	AFB-DC-R1	TCCTCTCCTACACTCAAGTCTCC	
<i>M. plutonius</i>	EF-DC-F1	AAGAGTAACTGTTTTCTCTG	208
	EF-DC-R1	TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	
<i>L. fusiformis</i>	L. fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGT TATTTTCAC	129
	L. fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCTTATC	
<i>K. oxytoca</i>	Klebsiella-F	GAACGGTAATCACAGCGCC	208
	Klebsiella-R	CAGCATATGGCGGTTCG	
SBPV	SBPV-F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224
	SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA	
β -actin**	β -actin 151 F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	151
	β -actin 151 R	GACCCACCAATCCATACGGA	

* Min *et al.*, 2016.

** Yang and Cox-Foster, 2005

binding efficiency를 가름하여, 11종 전체의 PCR에서 각기 특이 유전자 검출에 가장 유리하다고 판단되는 annealing 온도는 53.2 °C로 계산되었다(Figure. 1의 가로선). 11종 모두에 대한 annealing 온도로 53.2 °C를 설정 하였을 때, BQCV, CBPV, IAPV, kSBV, SBPV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *K. oxytoca*는 각 최적annealing 온도를 사용하였던 PCR들과 유사한 결과를 보였으나, DWV, *L. fusiformis*는 각 PCR annealing 온도와 각 3.8 °C, 2.8 °C의 차이를 보이고, 또한 SBV의 경우는 8.2 °C의 차이를 보인 만큼 최적 온도조건에서 벗어난 PCR 결과를 보였다. 이들의 경우 Ct 값에서 평균 1.06 cycles의 손실을 보였으나, 각 PCR 산물은 충분한 수준의 DNA 증폭이 나타나 이후의 분석에서 큰 불리함이 발견되지 아니하였다.

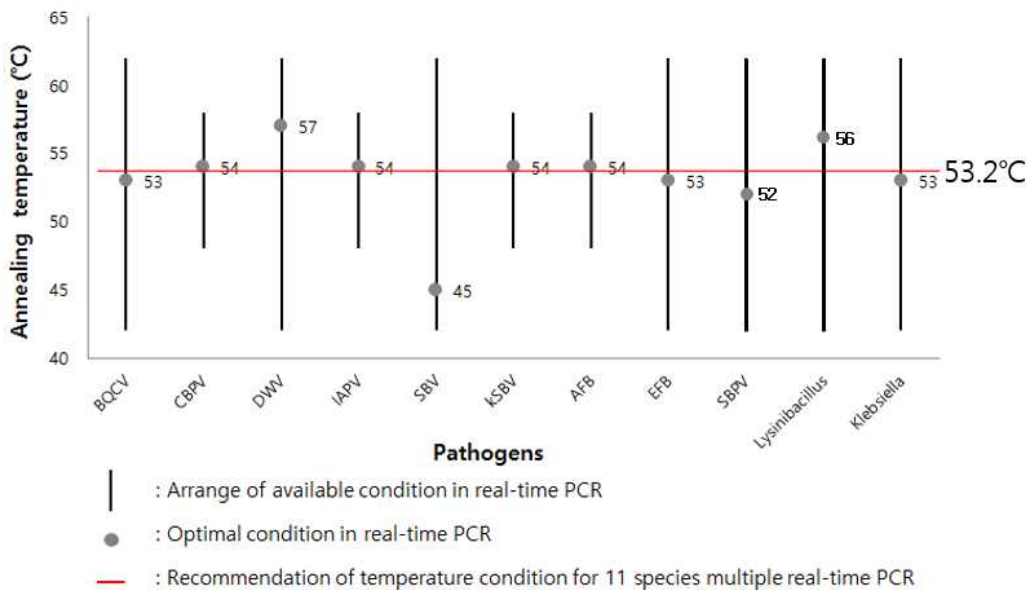


Figure 1. Optimal annealing temperature for detection of *Bombus* pathogens

Real-time PCR conditions for each target were optimized excluding annealing temperature. PCRs were performed using 42 °C ~ 62 °C or 48 °C ~ 58 °C as annealing temperatures. The template DNA was used for all real-time PCRs as same amount of 1.0×10^5 molecules of each specific target. Best annealing temperature was determined as 53.2 °C for all PCRs against 11 pathogens (horizontal red line). Vertical line was indicated accepted temperatures for annealing in each successful PCR. Black point was best annealing temperature for each specific PCR.

라. 병원체 검역을 위한 뒤영벌 gDNA 적정 사용량

Real-time PCR법을 사용한 서양뒤영벌 검역에서 병원체 감염 시료로부터 DNA를 분리하였고, 정량화된 주형 DNA으로서 병원체 특이 유전자를 검출하고자 하였다. Real-time PCR 검출 한계 측정에서 서양뒤영벌의 gDNA를 각 50 ng을 포함시켜 실시간 PCR을 수행하였고, 그 결과는 각 병원체 11종에 대한 특이 유전자의 증폭이 서양뒤영벌의 gDNA 유무와 관련없이 각기 특이 유전체들만 증폭됨이 확인되었으며, 각 Ct 값에서도 큰 불리함은 발견되지 아니하였다. 11종에 각각에 대한 PCR을 수행하였으며, kSBV-specific 유전자 검출 PCR의 경우, 50 ng gDNA의 존재 유무와 무관하게 1.0×10^2 분자까지 무난히 검출할 수 있었다 (Figure. 2).

그러나 10^1 분자에 대한 특이 유전자의 증폭은 뒤영벌 gDNA에 의한 비 특이적 증폭산물의 간섭으로 특이유전자 증폭의 정확성이 떨어지는 것으로 관찰되었으며(용점 분석 결과), 100 ng의 뒤영벌 gDNA를 사용하였을 경우, 이런 경향은 조금 더 높아지는 것으로 파악되었다 (자료 미제시). 따라서 감염 의심 시료로부터 분리한 주형 DNA를 50 ng 이하로 사용하는 것이, 뒤영벌 병원체의 특이 유전자 증폭에서 정확성과 민감성을 가장 높이는 조건으로 사료 된다.

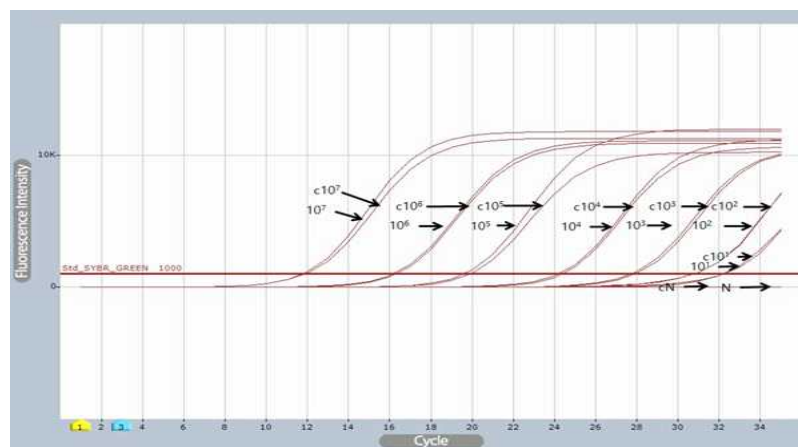


Figure 2. The limit of kSBV-specific detection with gDNA or without gDNA.

Template DNA were serial diluted from 10^7 to 10^1 molecules of kSBV specific gene. kSBV-specific PCRs were performed using each diluted template, with and or without 50 ng gDNA from *Bombus* for estimation of detection limit. “c” were indicated PCRs with 50 ng chromosomal (genomic) DNA from *Bombus*. N is a negative control using deionized water instead of template DNA. kSBV-specific primer could detect 10^2 molecule of target successfully, with or without gDNA.

마. 뒤영벌 병원체의 특이 PCR 산물에 대한 용점 분석과 검출 한계

11종 뒤영벌 병원체 각각의 특이 유전자에 대하여 실시간 PCR에서 각 primer 쌍의 민감도를 측정하였다. 서양뒤영벌 gDNA 50 ng이 포함되게 하였고, 각 특이 기질은 10배씩 연속 희석시켜 실시간 PCR을 수행하였으며, 다중 PCR을 위한, annealing 최적 온도 53.2 °C (또는 53 °C)를 사용하여 실시되었다. 특이 유전자 증폭 확인을 위하여 용점 온도 분석을 실시하였으며, 각각의 T_m에 따라 특이 유전자 증폭과 비 특이적 유전자 증폭을 구분 할 수 있었다. 검출 한계 측정에서 낮은 수준의 특이 분자 수(10¹ ~ 10²)에 대한 유전자 증폭은 형광 그래프에서 모두 증가하는 모양을 보였으나, T_m값 분석을 수행하여 비 특이적 반응 산물을 구분하고 검출 한계를 판단하였다. 뒤영벌로부터 각각의 병원체에 대한 특이 primer 쌍에 의한 증폭산물의 정성적 판단은 T_m값 분석에서 쉽게 비 특이적 반응 산물을 구별할 수 있었다. CBPV의 경우 비 특이적 증폭산물이 낮은 수준의 특이 분자 수(10¹ ~ 10²)의 증폭 PCR에서 관찰되었으며, BQCV 특이 증폭산물의 T_m은 87.8 °C이고, 비 특이적 증폭산물의 T_m은 78.5 °C로 상호 9.3 °C의 차이가 있어 쉽게 구별할 수 있었다(Figure. 3).

BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, kSBV, SBPV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *L. fusiformis*, *K. oxytoca*도 각기 같은 방법으로 특이 유전자 증폭산물의 T_m값의 측정하였으며, 각 병원체에 대한 T_m의 평균은 각각 79.21 °C, 87.91 °C, 81.98 °C, 80.73 °C, 83.26 °C, 76.09 °C, 81.82 °C, 88.86 °C, 86.24 °C, 78.80 °C, 72.50 °C로 계산되었다. 이 과정에서 발견된 대표적 비 특이적 증폭산물도 T_m값을 측정하였으며, 특이 증폭산물의 T_m값과 함께 병기하였다 (Table 4).

본 연구인 뒤영벌 병원체 검출을 위한 다중 PCR 검출법은, 실험실적 표준 검사법으로 민감도를 측정하였으며, 이를 약술하면, 뒤영벌 시료의 total DNA와 total RNA를 추출하고, DNA 병원체에 대하여는 그대로 DNA 시료를 사용하며, RNA 병원체(RNA viruses)에 대하여 cDNA를 만들어 각기 11종의 PCR들을 동시에 진행하는 것이다. 본 검사법의 실험실적 민감도는 50 ng 핵산을 각 PCR에 사용하고, 각 특이 기질을 계단 희석하여 각각의 PCR에서 증폭에 의한 검출 가능 범위를 측정하는 것이었다. 결과로써 DWV, SBV의 경우 1.0 x 10¹의 분자까지 특이적으로 검출할 수 있었으며, CBPV, IAPV, kSBV, SBPV의 특이 증폭에서는 1.0 x 10²의 민감도를 보였고, BQCV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *L. fusiformis*, *K. oxytoca*에서는 1.0 x 10³의 민감도를 보여 주었으며(Figure. 4), 이는 뒤영벌 gDNA 50 ng

의 존재 하에 각각의 병원체에 대한 특이 유전자 증폭 검출 한계를 의미한다.

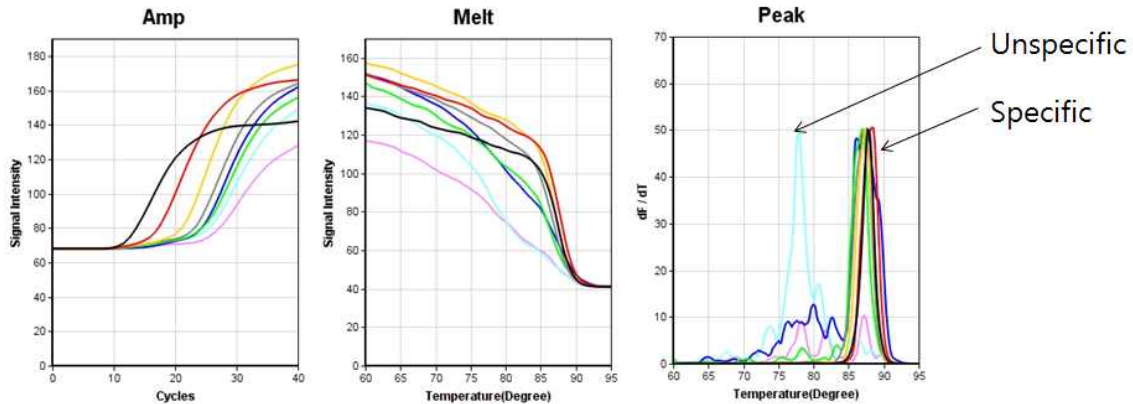


Figure 3. CBPV-specific detection using CBPV-specific PCR and its Tm analysis
 CBPV-specific DNA were amplified with standard condition using CBPV-specific real-time PCR. Target DNA were serial diluted from 10^6 to 10^1 molecules per PCR including 50 ng *Bombus* gDNA. Deionized water were used as negative control. Tms were calculated as 87.8 °C for specific targets and as 78.5 °C for unspecific amplicon (10^1 molecules of CBPV-specific DNA). Amp, Melt, Peak were indicated changes of fluorescence in each PCR amplification, re-association, and dF/dT, respectively.

— N, — P, — 10^6 , — 10^5 , — 10^4 , — 10^3 , — 10^2 , — 10^1 molecules of specific target.

Table 4. Tm values for the amplicons of specific targets and unspecific amplicons in *Bombus* pathogen-specific PCRs

Pathogens	Melting temperature of specific amplicon(°C)	Melting temperature of unspecific amplicon(°C)
BQCV	79.21±0.28	75.46±0.24
CBPV	87.91±0.37	78.59±0.68
DWV	81.98±0.34	72.88±0.74
IAPV	80.73±0.34	91.54±0.76
SBV	83.26±0.43	-
kSBV	76.09±0.34	78.15±0.50
SBPV	81.82±0.29	-
<i>P. larvae</i>	88.86±0.50	74.22±0.65
<i>M. plutonius</i>	86.24±0.41	-
<i>L. fusiformis</i>	78.80±0.33	-
<i>K. oxytoca</i>	72.50±0.36	70.50±0.66

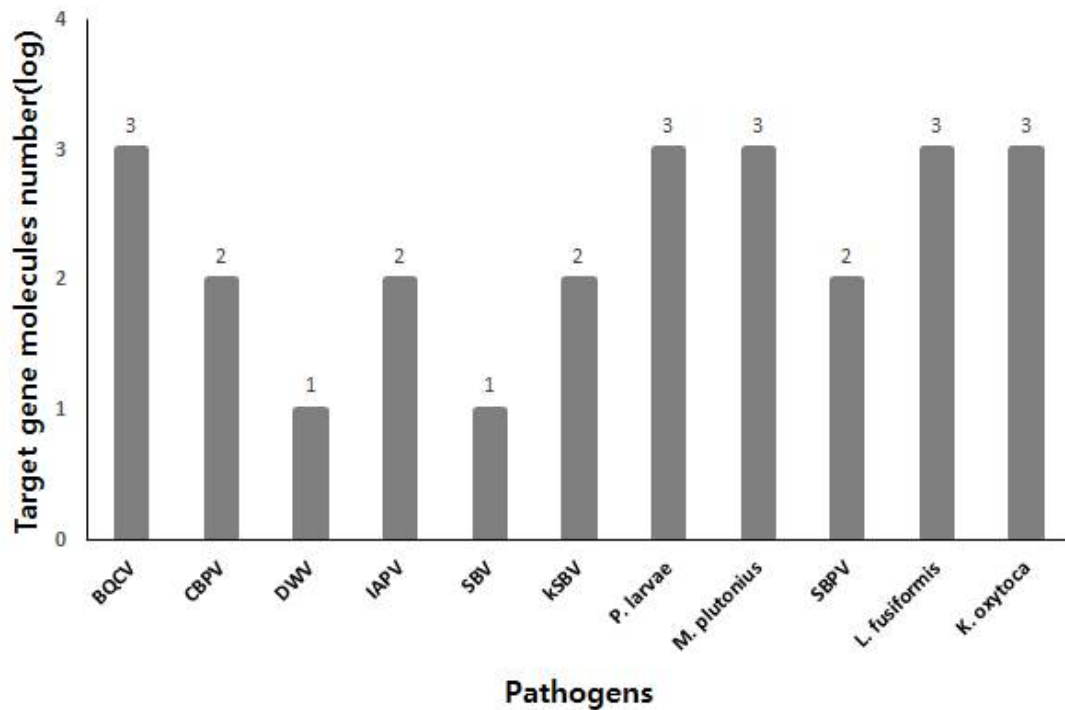


Figure 4. Detection limit of *Bombus* pathogen-specific real-time PCR

PCRs were performed with serially diluted, each specific DNAs including 50 ng *Bombus* DNA. Accurate detections were available under condition of limited molecules of specific targets. “1”, “2”, and “3” were indicated 1.0×10^1 , 1.0×10^2 , and 1.0×10^3 molecules of specific targets, respectively. Each accuracy under these conditions was calculated over 0.98 in regression coefficient.

바. 다중 실시간 PCR을 사용한 서양뒤희벌 시료의 병원체 검출 및 판정

국내에 유통되고 있는 서양 뒤희벌에서 뒤희벌 병원체의 존재여부를 밝히기 위하여, 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원에서 생산된 뒤희벌을 검출용 시료로 사용하였으며, 보통 뒤희벌 성체 1마리로부터 gDNA와 total RNA를 각기 분리하여 검사하였다. 뒤희벌 병원체 특이 실시간 PCR은 동일 시료에서 분리된 RNA에서 제작된 cDNA를 주형으로 11종의 PCR을 동시에 수행하는 것으로써, 병원체 특이 증폭산물을 확인하여 그 존재여부를 판정하였다.

먼저, 전라도 보성산 서양 뒤희벌에 대한 검사에서, BQCV-specific PCR은 BQCV-특이 산물을 형성하였고, 79.2 °C의 정확한 Tm값을 보여주어 BQCV 양성(+)으로 판정되었으나,

70.0 °C, 86.5 °C의 T_m값을 가진 판정과는 무관한 작은 비 특이증폭도 나타났다. 이 BQCV-특이 증폭은 전기영동에서도 계산된 크기인 233 bp와 일치하는 것으로 나타나 전기영동과 무관하게 다중 실시간 PCR에 의한 판정이 가능함을 보여주었다(자료 미제시). *L. fusiformis* 특이 PCR에서 특이 산물을 형성하였으며, 보성 시료에서 79.1 °C의 T_m을 보여주어 양성(+)으로 판정하였다. 또한 CBPV, SBV, kSBV의 PCR에서도 증폭산물은 관찰되었으나, 각각의 표준 산물의 T_m값과 다른 결과가 나와 비 특이증폭으로 판단되었다. 또한 *K. oxytoca* 특이 PCR에서도 증폭산물은 관찰되었으나, 각각 표준과 다른 T_m값을 보이고, 용점곡선이 다수의 비 특이증폭임을 나타내어, 쉽게 음성으로 판정할 수 있었다. *P. larvae* 증폭산물의 경우 Ct 그래프의 증폭 곡선도 약하게나마 확인이 되었고, T_m값도 88.5 °C로 측정되어 *P. larvae* 특이 증폭으로 보이거나, 극히 소량의 *P. larvae* 특이 DNA가 존재하였다 판단하고, 음성(-*)으로 판정하였다(Figure. 5; Figure. 6).

또한, 경기도 광주의 서양뒤영벌에서는, BQCV, SBV, SBPV, *P. larvae*에 대하여 각기 DNA 증폭을 보여 주었고, 각 용점분석에서 SBV 증폭산물은 83.0 °C의 T_m값을 나타내어 양성(+)으로 판단되었으며, BQCV 증폭산물은 72.5, 80.5, 84.5 °C의 T_m값을 보여 specific 유전자가 있는 것으로 판단되나, 확정검사가 요구되기에 양성 의심(+/-)으로 판정하였고, SBPV 증폭산물의 경우 81.5 °C의 T_m값을 나타내는 PCR산물이 관찰되었으나, 확정 검사가 요구되기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다(자료 미제시).

경상남도 밀양의 서양 뒤영벌에서는, SBV, SBPV의 증폭산물이 관찰되었으며, SBV 증폭산물 용점분석에서 83.5 °C의 T_m값이 계산되어 양성(+)으로 판정하였으며, SBPV 증폭산물은 81.5 °C의 T_m값을 나타내는 PCR 증폭산물이 관찰되었으나, 확정 검사가 요구되기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다(자료 미제시).

경상북도 청송의 서양뒤영벌에서는 SBV 증폭산물이 84.0 °C의 T_m값을 나타내고, 이 또한 확정 실험을 요구하기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다. 경상남도 창원시의 서양 뒤영벌에서는 양성 의견을 보이는 병원체가 발견되지 아니하였다(자료 미제시).

국내 5개소에서 생산된 뒤영벌들에 대한 11종의 병원체 유전자 검색은 각각의 병원체 특이 유전자의 PCR 산물의 Ct값과 T_m값 그리고 전기영동에 의한 재확인과정을 통하여 판정하였으며, 모든 자료가 너무 방대하여 정리된 결과를 제시하지 아니하였다(자료 미제시).

한편, SBPV 증폭산물들은 광주, 밀양, 보성의 시료에서, 형광값이 크게 증가되는 것으로 관찰되었고, 각 증폭산물들에 대한 T_m 분석에서 각기 80.5 °C 또는 81.5 °C로 측정되었으며, 전기영동의 결과 예상 SBPV 증폭산물의 크기인 224 bp의 DNA 산물들이 약하게 관찰되었다(자료 미제시). 국내에 SBPV 존재는 아직 보고된 바 없으며, 본 연구를 위해

Oligonucleotide를 이용하여 DNA를 합성 후 재조합 DNA를 사용하였기에 본 연구의 후속 연구로써 보완되어야 할 것이다.

본 연구는 그간 주목을 받지 못하였던 서양 뒀영벌의 병원체들을 쉽게 모니터링하고 적절히 제어하기 위하여 해당 병원체들을 빠르고 쉽게 검출할 수 있도록 고안된 것이다. 서양 뒀영벌의 병원체들에 대한 관심은 이 화분매개 곤충의 수출입에 대한 관심과 함께 증대되고 있으며, 국내외로 미흡하였던 수출입 검역 검사의 요구에 부응하는 것이라 할 것이다. 본 연구에서 제안하는 뒀영벌 병원체 특이 다중 실시간 PCR (*Bombus* pathogens specific multiple real-time PCR)법이 질병 제어 및 검역현장에서 널리 사용되기를 기대한다.

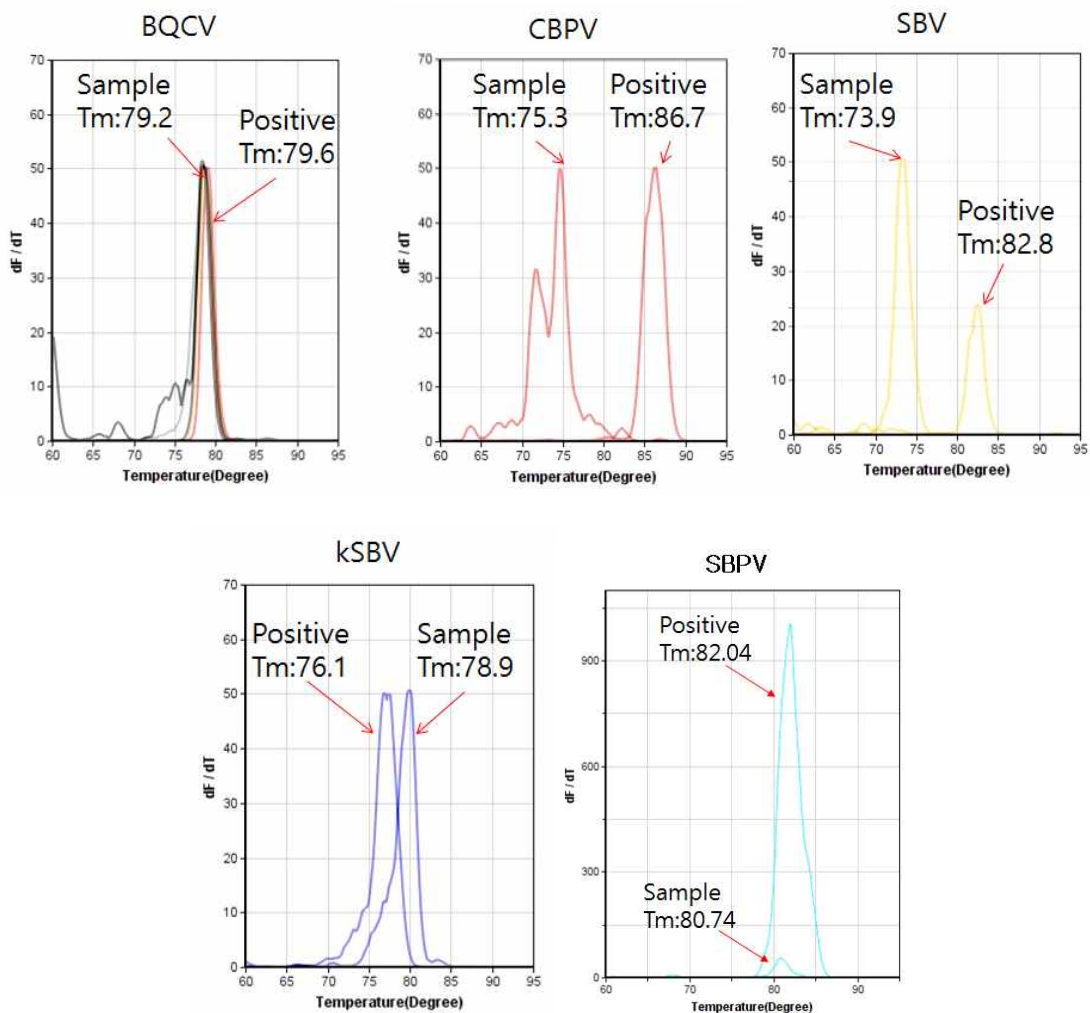


Figure 5. Tm and electrophoretic analysis of *Bombus* viral pathogens-specific real-time PCR using *Bombus* species produced from Boseong, Korea

cDNA originated from *Bombus* sample was used to perform 7 specific real-time PCRs. After PCR amplifications, melting temperature analysis were performed independently against 7

viral pathogens. BQCV-specific DNA (233 bp) was accurately detected based on T_m analysis. CBPV- (230 bp), SBV- (236 bp) and kSBV- (121 bp) specific DNAs were not found. With only these results, the existence of SBPV-specific DNA (224 bp) could not be determined.

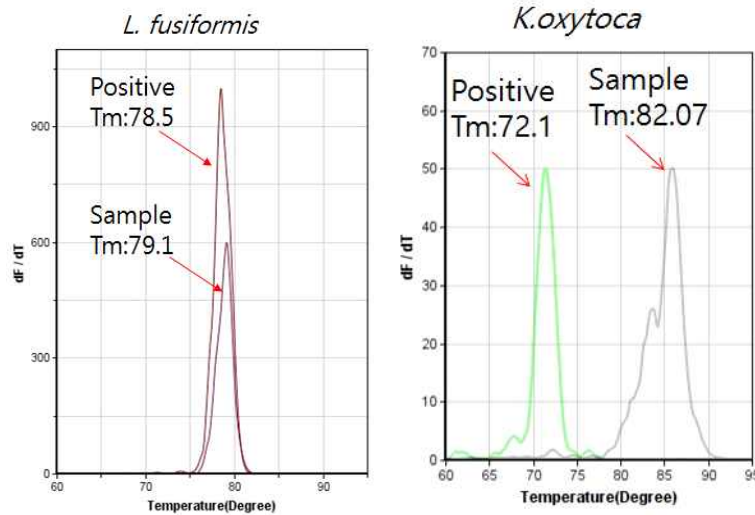


Figure 6. T_m and electrophoretic analysis of *Bombus* bacterial pathogens-specific real-time PCR using *Bombus* species produced from Boseong, Korea

DNA originated from *Bombus* sample was used to perform 4 specific real-time PCRs. Melting temperature analysis were performed independently against 4 bacterial pathogens. It is determined that all 4 bacterial-specific DNAs (*P. larvae* 243 bp, *M. plutonius* 208 bp, *L. fusiformis* 129 bp, *K. oxytoca* 208 bp) were not amplified from *Bombus* sample.

4. 결론 및 요약

DWV, IAPV, KBV, SBV, BQCV, kSBV, SBPV and *Paenibacillus larvae*, *Mellisococcus plutonius*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca* 의 뒤영벌 병원체들에 대한 다중 실시간 증합효소 연쇄반응법(PCR)을 개발하였다. 하나의 시료에서 추출된 핵산은 11종 PCR들에 같은 시간 및 조건으로 사용될 수 있으며, 각 병원체 특이 표적 DNA가 PCR 기질로 1000분자가 존재한다면, 해당 특이 PCR 증폭산물들은 정성적, 정량적으로 20분안에 성공적으로 증폭되었다.

우리가 제안하는 이 다중 PCR 검출법이 뒤영벌의 국제교역을 위한 검역검사에 사용되기를 기대한다.

제 5 절 다중PCR증폭과 특이 DNA-chip을 활용한 꿀벌 주요 11종 병원체의 검출법 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 31(2): 133-146 (2016)에 Development of a Detection Method against 11 Major Pathogens of Honey Bee using Amplification of Multiplex PCR and Specific DNA-chip의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

꿀벌의 감염성 병원체는 바이러스, 세균, 진균 모두에서 총 35종이 보고되어 있으며(Chen and Siede, 2007; Runckel *et al*, 2011; Li *et al*, 2014), 이중 국내에서는 15종 병원체의 존재가 확인된 바 있다. 본 연구는 국내 양봉에 가장 많은 피해를 준 것으로 판단된 11종의 병원체를 대상으로, 한 번의 검사로써 어느 병원체가 시료 중 우점적으로 존재하는가를 판정하고자 하였다.

11종 꿀벌 주요 병원체는, 오랜 기간 국내 양봉에 큰 피해를 입혀온 미국부저병(American Foulbrood disease; AFB)의 원인균, *Paenibacillus larvae*, 유럽부저병(European Foulbrood disease; EFB)의 원인균 *Melissococcus plutonius*의 2대 세균성 병원균을 포함하며, 백묵병(Chalkbrood; CB)의 병원체 *Ascospaera apis*, 석고병(Stonebrood; SB)의 주요 병원체인 *Aspergillus flavus* 그리고 근래 맹위를 떨치고 있는 노제마병의 원인균 *Noema ceranae*의 진균 3종도 대상으로 하였다. 또한 검출이 어려운 이유로 그 피해가 추정되어 왔던 바이러스성 질병에 대하여 BQCV (Black Queen Cell Virus), CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus) DWV (Deformed Wing Virus; 날개불구병), IAPV (Israeli Acute Paralysis Virus), SBV (Sacbrood Virus), kSBV (Korean Sacbrood Virus; 한국형 낭충봉아부패병)의 6종을 검출대상에 포함하였다.

이중 kSBV는 국내 동양종 꿀벌에서 발견된 SBV의 일종으로 2010년 이래 국내 토종벌의 75%이상을 폐사시킨 원인체로 주목되고 있으며(Choi 등, 2010). 또한 진균으로 분류되는 *Noema ceranae*는 종래의 노제마병 원인체인 *Noema apis*를 대체할 정도로 맹위를 떨치고 있는 기생성 병원체이기도 하다.

상기 11종의 꿀벌 병원체들에 대한 특이 유전자 검사법은, 주로 PCR을 기반으로 수많은 개별검사법이 개발되었으며, 다양한 검사 목적을 충족시키기 위하여 다양한 방식의 유전자 검사법이 개발되었다 (Carletto *et al*, 2010; 임 등, 2016).

우선, 개별병원체의 정량적 검출을 위하여, 다수의 정량 PCR (quantitative PCR)법이 보고 되었으며(Han *et al*, 2011; Bu *et al*, 2005), 특정 병원체의 빠른 검출을 위하여 초고속 PCR (Ultra-rapid PCR)법이 개발되었고(Han *et al*, 2008; Yoo *et al*, 2011; Yoo *et al*, 2012; Lim and Yoon, 2013), 현장신속검사를 위하여 Ultra-fast PCR (UF-PCR)법 및 LAMP (Loop-mediated amplification)법이 보고되었다(왕 등, 2016; Lee *et al*, 2016). 또한 보다 쉬운 병원체 검사를 위하여, 각 꿀벌 병원체에 대한 면역크로마토그래피법 (Immunochromatography)이 개발되고 있으며, 이는 가까운 미래에 상업적 생산이 시작될 것으로 파악되고 있다(Unpublished communication).

앞에 거론된 병원체의 검사법들은, 모두 특정 병원체의 존재여부 및 그 양을 판정하는 방법 이기에, 꿀벌 질병시료로부터 원인체가 무엇인지를 밝혀내기 위하여, 많은 종류의 특정 병원체에 대한 검출법들을 하나씩 병렬 수행하여야 하였다. 꿀벌질병의 진단분야에서 어느 병원체인가를 알아낼 수 있는 종합적 검사법(정성검사)에 가장 접근한 것은 multiplex PCR 검사법이며, Sguazza 등 (2013)은 꿀벌 병원성 바이러스 6종 ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV의 개별 존재여부를 판정할 수 있는 multiplex PCR검사법을 제시하였다. 그러나 이 multiplex PCR검사법은 아가로오스 전기영동 상에서 해당 PCR 산물의 크기로 판정하여야만 하고, 또한 꿀벌 바이러스 6종만을 대상으로 한다는 점에서 응용에 제한적인 면이 있었다.

한편, DNA chip은 합성 oligonucleotide (probe)들을 각각 공유 결합으로 slide glass 표면에 미세배열 (micro-array)로 in situ 탑재(spotting)시켜, 상보적 염기서열을 가진 특이 DNA가 각 probe에DNA:DNA hybridization되게 하는 실험법이다(E.M. Southern, 1992). 근래, 특이적으로 증폭시킨 PCR 산물들을, 별도의 특이 염기서열을 가진 probe들을 탑재한 DNA-chip에 hybridization시킴으로써, 염기서열 특이성이 PCR과 hybridization으로 배가 시킨 실험법들이 개발되었고, 높은 특이성과 이중 확인의 장점, probe의 종수에 제한이 거의 없다는 점 등에 고무되어, 여러 병원체의 종합적 검사 (정성)에 다양하게 응용되게 되었다(Sarshar 등, 2015; Li, 2016). 그러나, 꿀벌 질병에 대하여 통합적, 정성적 병원체 검사를 수행할 수 있는 DNA chip에 관한 개발은 아직까지 보고된 바가 없었다.

따라서, 본 연구는 특정 병원체의 각개 검출에 기반을 둔 현재의 꿀벌 질병 진단법을, 통합적, 정성적 병원체 검사로 통합시키기 위하여, 11종 꿀벌 주요병원체의 개별 검출을 위한

multiplex PCR법을 개발하고, 각 병원체 특이 PCR산물을, 각 병원체 특이 probe를 탑재시킨 DNA-chip으로 판정하는 일련의 새로운 검사법을 새로이 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 수집과 RNA 및 DNA 확보

꿀벌 질병 시료는 2016년 5월 경기대 양봉장에서 수집된 kSBV 감염체를 사용하였다. 치사되어 일벌에 의하여 소문 밖으로 배출된 유충을 수집하였으며, 이를 MagNa lyser (Roche, Korea)로 분쇄하고 RNA iso plus (Takara, Japan)를 이용하여 total RNA를 순수분리하였다. 분리된 RNA는 spectrophotometer에 의한 정량 후, 그 중 1 µg을 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA 합성을 수행하였고, 이 cDNA와 total RNA들은 -70℃에서 보관하며 실험에 사용하였다.

본 연구에서 PCR 주형으로 사용한 재조합 DNA체들은 각 꿀벌 병원체에서 유래된 특이 염기서열을 포함하고 있는 것이며, 경기대 유전학실험실에 보관된 것들이다. 본 연구를 위해 공여 받은 재조합 DNA들의 목록 및 각 유전자 정보, 문헌 정보들은 다음 표와 같다(Table. 1).

Table 1. The recombinant DNAs of honey bee pathogens

Pathogens	Name of Clone	GenBank accession	
		No.	Reference
BQCV	pGEM-BQCV-RdRp	EF517515	Giang <i>et al</i> , 2014
CBPV	AM-CBPV	EU122231	최 등, 2008
DWV	pLUG-DWV-RdRp	NC004830	이 등, 2015
IAPV	pDrive-IAPV-RdRp	NC009025	Unpublished
SBV	pBX-SBV3	AF092924	Kim Cuc <i>et al</i> , 2008
kSBV	pGEM-kSBV-VP1	HQ322114	Unpublished
<i>Paenibacillus larvae</i>	pBX-P.la-16s-797	U85263	Unpublished
<i>Melissococcus plutonius</i>	pDrive-EFB	X75751	하 등, 2005
<i>Ascosphaera apis</i>	pBX-A.apis	M83264.1	이 등, 2004
<i>Aspergillus flavus</i>	pBX-A.flavus	D63696	Lee <i>et al</i> , 2015
<i>Nosema ceranae</i>	pCR2.1-Nosema	DQ486027	In this study

나. 꿀벌 병원체 11 종에 대한 Multiplex PCR 설계 및 제작

꿀벌 병원체 11종에 대한 특이적 PCR primer 11쌍은, 22개 primer들에 의한 Multiplex PCR을 가능하게 하기 위하여, 또한 생성된 특이 PCR산물이 DNA-chip에 탑재시킨 probe들 (oligonucleotides)과 우수한 hybridization이 가능하게 하기 위하여, Table 1의 재조합체에 탑재된 각 병원체에 특이적 염기서열을 근거하여 설계하였다. 각 primer의 주문제작 후, Multiplex PCR의 적합성을 Real-Time PCR을 통하여 평가하였으며, 부적합한 primer에 대하여 퇴출, 재설계, 재선발하였고, 최종적으로 DNA-chip에 탑재시킨 probe들과의 특이성을 분석하여 재설계 및 재선발을 반복하였다. DNA-chip의 probe oligonucleotide들과 hybridization결과를 판정하기 위하여 PCR primer 11쌍은 각 primer의 5'-말단에 형광원 Cy3가 결합된 형태로 주문 제작되었으며(Bioneer 사, Korea). Primer쌍들의 평가에 사용된 Real-Time PCR은 SyberGreen을 형광원으로 사용하였다. Real-Time PCR 기기는 Exicycler TM96 (Bioneer, Korea)을 사용하였다.

Table 2. Origins and names of primer sets for multiplex PCR

Pathogen	Name of Primer	GenBank accession No.	Reference
BQCV	BQ-PCR-F1/R1	EF517515	this study
CBPV	CB-PCR-F1/R1	EU122231	this study
DWV	DW-PCR-F1/R1	NC004830	this study
IAPV	KBIA-PCR-F2/R2	NC009025	this study
SBV	SB-PCR-F1/R1	AF092924	this study
kSBV	kSB-PCR-F1/R1	HQ322114	Unpublished
<i>Paenibacillus larvae</i>	AFB-PCR-F1/R1	U85263	this study
<i>Melissococcus plutonius</i>	EFB-PCR-F1/R1	X75751	this study
<i>Ascosphaera apis</i>	AA-PCR-F1/R1	M83264.1	this study
<i>Aspergillus flavus</i>	AF-PCR-F1/R1	D63696	this study
<i>Nosema ceranae</i>	NO-PCR-F2/R1	DQ486027	this study

다. 콜별 병원체 11종에 대한 22-Multiplex PCR의 최적화

11종 각 병원체 특이 DNA 주형은 각 재조합체를 사용하였으며, 실험에 사용된 평균 DNA copies는 10^5 개로 하였다. 먼저, 각 병원체 특이 DNA 주형을 대상으로 특이 PCR primer쌍을 사용하여 각기 혼성화(annealing) 온도구배 PCR (temperature-gradient PCR)을 수행하여, 최적 혼성화 온도 및 가능 온도 범위를 구하였으며, 이를 기준으로 22-multiplex PCR의 최적 혼성화 온도를 설정하였다. PCR 반응액은 일반적으로 $20\mu\text{l}$ 를 기준으로 하였으며, 사용된 PCR premix는 Greenstar master mix (Bioneer, Korea)이었다.

11종 DNA 주형에 대한 22-multiplex PCR은 PCR cycle에 따른 형광강도의 증가 및 각 병원체 특이 증폭 산물의 양에 따라 평가하였으며, 이에 따라 22-multiplex PCR의 조성 및 조건을 최적화하였다.

최적화된 22-multiplex PCR의 조건은 22-Asy-primer mix를 사용하고, 초기 변성 단계 94°C 5분 후, 변성 단계 94°C 30초, 중합 단계 52°C 30초, 신장 단계 72°C 30초씩 진행하여 총 35cycles 반복하는 것이었다.

22-Asy-primer mix는, 특이 PCR산물과 DNA-chip에 탑재된 probe oligonucleotide들과 hybridization을 증진시키기 위하여, 비대칭(asymmetric) 양의 PCR primer 쌍들로 primer-mixture를 조성한 것이다. 즉, 각 병원체에 대한 특이 primer쌍들을 1:4 또는 4:1 또는 1:2 (forward : reverse primer의 양)로 맞추어 조성한 것으로 hybridization후 각 SBR값 (Spot/Background ratio)을 토대로 최적비율을 구하고, 이 결과를 토대로 최적 22-asy-primer mix를 조성하였다.

라. DNA chip의 oligonucleotide probe 설계 및 제작

DNA-chip에 탑재시킬 oligonucleotide probe들은 각 병원체 특이 PCR산물의 내부 염기서열을 사용하였으며, 병원체별로 특이적 hybridization이 가능하도록 설계하여 주문 제작되었다 (Bioneer, Korea). 특이 oligonucleotide probe들은 DNA-chip, K-CAP™에 탑재되어 hybridization 및 평가과정을 거쳤으며, 이 역시 Multiplex-PCR에 의한 특이 PCR 산물들과 특이적 hybridization, 그리고 비특이적 hybridization을 평가하여 재설계, 교체 탑재의 과정을 반복하였다. 설계된 DNA-chip의 제작은 K-MAC (Korea)에서 담당하였으며, hybridization의 평가에서도 K-Mac의 K-SCAN-CAP™ scanner (K-MAC, Korea)와 관련 software program (K-MAC, Korea)을 사용하였다.

마. 11종 꿀벌 주요 병원체 검출을 위한 DNA chip 제작



Figure 1. K-CAP™, DNA chip for detection of honey bee pathogens manufactured by K-Mac, Korea

K-CAP™은 K-Mac사에서 제작된 소형 DNA-chip이며, 외형상 200 μ l의 원심분리관을 닫을 수 있는 마개에 유리봉이 관통된 형상이다. PCR용액에 원심분리관내 유리봉이 잠기게 되며, 그 유리봉 단면이 probe oligonucleotide들을 미세 배열시킬 수 있는 면이다(Fig. 1).

꿀벌 질병 원인균 11종에 특이적으로 합성된 probe oligonucleotide들은, 고정액에 각 probe가 20 pmole/ μ l 또는 40 pmole/ μ l가 되도록 농도를 조정하였으며, 이 probe 용액은 sciFLEXARRAYER S11 (Scienion, Germany)을 사용하여, aldehyde기로 표면처리를 한 K-CAP™의 유리봉 단면에 위치 특이적으로 각 200 pl씩 분주(spotting)하였다. 분주된 probe는 직경 200 μ m의 spot 형태가 되었으며, 중심간 거리(center to center; CTC)는 180 μ m가 되도록 조정되었다. Probe의 분주 후 25 $^{\circ}$ C, 70%의 습도 하에서 3시간 동안 K-CAP™ 표면의 aldehyde기와 probe의 amine기와의 결합을 유도하였으며, 반응 종료 후 Prehybridization Buffer (2x SSPE, 0.2% SDS)를 사용하여 표면에 결합하지 못한 여분의 probe들을 제거하였다(K-MAC, Korea).

바. Hybridization 및 Washing 최적화

22-Asy primer mix를 사용하여 각 병원체의 특이 염기서열을 주형으로 하여 multiplex PCR을 마친 후, 각 병원체의 특이적인 PCR 산물이 생성된 PCR용액들은 각기 혼성화(hybridization)에 사용되었다. 혼성화는 95 $^{\circ}$ C 5분 변성 후, 52 $^{\circ}$ C, 300 rpm의 진동(Thermo-mixer comfort, Eppendorf, Germany)하에 4시간 수행하는 것이 최적의 결과를 보였으며, 혼성화 후 세척(washing)과정은 4 \times SSC buffer, 0.2 \times SSC buffer, D.W. 순으로 진동 300 rpm과 42 $^{\circ}$ C 온도 조건에서 5분씩 세척하는 것이 최적의 것으로 나타났다.

이 최적 혼성화 온도를 정하기 위하여 47 $^{\circ}$ C, 52 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C를 비교하였으며, 세척과정의 온도 및 세척액 조성 (2xSSC, 4xSSC)을 비교하였다. 결과의 평가는 증류수로 세척 후 각 spot의 SBR (Spot/Background ratio)값을 기준으로 비교 분석하였다.

사. Multiplex PCR과 DNA-chip을 이용한 꿀벌 주요 병원체 11종에 대한 표준 검사법의 확립

11종의 병원체에 대한 표준 주형은 각 특이유전자 10^5 분자(약 20 pg)를 사용하는 것이며, 표준 primer set는 22종의 PCR primer가 비대칭적으로 혼합된 22-Asy-primer mix (100 pmole/reaction)와 표시자 primer PC1을 0.2 pmole/reaction을 사용하는 것이다. PCR 반응액은 총 20 μ l이었으며, Greenstar master mix (Bioneer, Korea)를 기반으로 multiplex PCR을 수행하였다.

Multiplex PCR 조건은, 초기 변성 단계 94°C 5분 후, 변성 단계 94°C 30초, 중합 단계 52°C 30초, 신장 단계 72°C 30초씩 진행하여 총 40 cycles 반복하는 것이며, hybridization은 52°C, 300 rpm의 진동 하에서 4시간 진행하고, washing은 42°C, 300 rpm의 진동 하에서 각기 0.5 ml 4×SSC buffer, 5분, 0.5 ml 0.2×SSC buffer, 5분, 0.5 ml D.W. 5분으로 순차적 세척을 하고, 최종적으로 LightCycler® 480 Multi-well-plate 96, white (Roche, Korea)를 사용하여 3,500 rpm, 2분 간 원심분리하여 DNA-chip 표면을 건조시키는 것이다. Hybridization의 영상은 K-SCAN-CAPTm으로 스캔하고, 산출된 SBR값(Spot/Background ratio)을 토대로 평가하는 것을 표준 실험법으로 하였다.

아. 현장 적용을 위한 kSBV에 감염된 검체를 사용한 확정 시험

kSBV에 감염된 동양종 꿀벌의 유충으로부터 total RNA를 순수분리하였고, 그 중 1 μ g을 사용하여 총 20 μ l cDNA 변환을 수행한 후, 그 중 1 μ l을 주형으로 사용하여 22-Asy primer mix를 사용한 Multiplex PCR 및 DNA-chip에 의한 hybridization을 수행하였다. 모든 실험은 표준검사법에 준하여 실시하였다.

한편, 검증을 위하여, DNA-chip실험에서 사용된 cDNA-target의 분자수를 kSBV-specific Real-Time PCR을 사용하여 target 분자수를 측정하였다. Real-Time PCR에서 사용된 primer 쌍은 22-Asy primer mix에 포함된 kSB-PCR-F1/R1이었으며, Real-Time PCR의 조성은 5 mM kSB-PCR-F1/R1와 PCR premix인 Greenstar master mix (Bioneer, Korea)로 하였으며, multiplex PCR의 경우와 같이 주형은 1 μ l kSBV cDNA로 진행하였다. Real-Time PCR의 조건은 초기 변성 단계 94°C 5분 진행 후, 변성 단계 94°C 30초, 중합 단계 52°C 30초, 신장 단계 72°C 30초씩 총 40 cycles 반복하였다. 한편 정량을 위하여 pGEM-kSBV-VP1 재조합 DNA를 target로 하였으며, 이를 초기주형양 10^5 분자, 10^4 분자, 10^3 분자 수 순으로 단계별 희석을 하여, 정량을 위한 회귀직선을 구하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 꿀벌 11종 병원체에 대한 특이 PCR 및 multiplex PCR 최적화

설계된 각 병원체에 대한 특이적 PCR 증폭을 확인하기 위하여, 그리고 multiplex PCR에서 최적 annealing 온도를 구하기 위하여, 각 특이 재조합 DNA 10⁵분자를 주형으로, 각 특이 primer를 반응 당 5 pmole씩 사용하여, 각기 계산된 융점(temperature of mid-point; T_m)값을 중심으로 온도구배 PCR을 시행하였다(Fig. 2).

11종 병원체에 대한 특이 primer 쌍들은 각 특이 PCR에서 각기 특이적인 증폭을 보여주었으며, 융점분석 (melting temperature analysis)에서 각기 고유의 T_m값을 나타내었다. 11종 특이 온도구배 PCR의 결과를 바탕으로, 가장 다수의 병원체들에서 높은 증폭량을 보이는 PCR annealing 온도가 52°C인 것으로 집계되었기에, 이를 multiplex PCR의 annealing 온도로 선정하였다(결과 미제시).

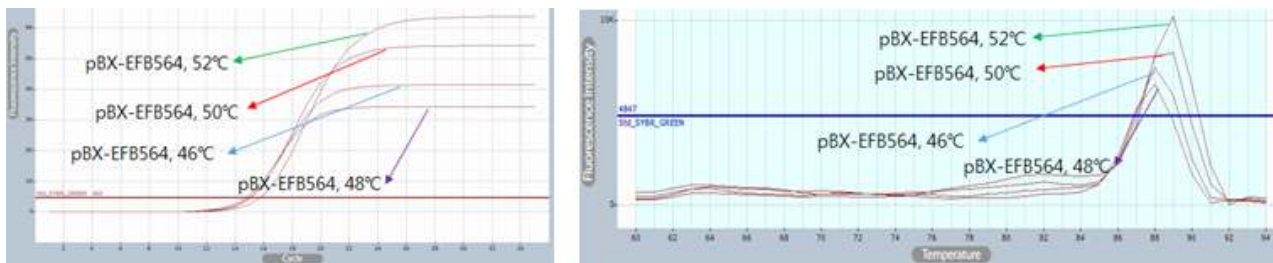


Figure 2. The amplification of *M. plutonius* (EFB)-specific DNA with specific primers using annealing temperature-gradient PCRs.

(Left) Fluorescence curves. *M. plutonius*-specific PCR products were differently amplified depend on annealing temperature, 46°C, 48°C, 50°C and 52. (Right) Melting-temperature analysis. The T_ms of *M. plutonius*-specific PCR products were estimated in range of 87.5–89.0°C.

꿀벌 병원체 11종에 대한 specific Multiplex-PCR은, 11쌍(22개)의 특이 primer들을 각 1 pmole씩 혼합하여 반응 당 총 22 pmole의 primer를 사용하고, 각 특이 DNA 10⁵분자를 주형으로 최적화를 시작하였다.

그러나, 각 primer들의 특이 결합친화도(binding affinity)가 서로 상이한 이유로, 11종 특이 PCR product들을 균일한 수준으로 생산할 수 없었기에, 특이 primer의 재선발 및 교체, primer간 혼합비의 변경 등을 통하여 가장 유사한 양의 특이 PCR산물을 각각 만들 수 있고, 동시에 DNA-chip상의 특이 probe들과 반응성이 좋은 조건을 만들 수 있는 primer-mix를 재구성하여야 하였다. 최종적으로 DNA-chip과의 반응성에서도 가장 우수한 multiplex PCR 용 primix를 조성할 수 있었으며, 이를 22-Asy primer mix (100 pmole/ each PCR)라 명명 하였다 (Table 3).

Table 3. Composition of 22-Asy primer mix for pathogen specific Multiplex-PCR & DNA-chip

Targets	Template(20pg)	Name of Primer	Forward primer/rtn	Reverse primer/rtn
BQCV	4.55×10^5 copies	BQ-PCR-F1/R1	4 pmole	1 pmole
CBPV	10^5 copies	CB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
DWV	5.14×10^5 copies	DW-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
IAPV	3.88×10^5 copies	KBIA-PCR-F2/R2	10 pmole	40 pmole
SBV	4.90×10^5 copies	SB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
kSBV	4.99×10^6 copies	kSB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
<i>P. larvae</i>	4.94×10^5 copies	AFB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
<i>M. plutonius</i>	4.20×10^5 copies	EFB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
<i>Ascospaera apis</i>	4.68×10^5 copies	AA-PCR-F1/R1	4 pmole	1 pmole
<i>Aspergillus flavus</i>	4.22×10^5 copies	AF-PCR-F1/R1	1 pmole	2 pmole
<i>N. ceranae</i>	4.10×10^5 copies	NO-PCR-F2/R1	1 pmole	4 pmole
Total primer quantity/reaction:			100 pmole	

각 특이 DNA 10^5 분자를 주형으로, 22-Asy primer mix를 사용한 최적화된 multiplex PCR 은, 각 특이 DNA를 정확히 증폭시켰으며, 9종의 target DNA (10^5 분자)에 대하여 각기 Ct (Threshold cycles)값이 20-23 cycles로 나타났다(단, kSBV와 IAPV의 Ct값은 28 cycles). 그러나, 11종 모두의 최종 형광값 (final fluorescence intensity)은 3.3 - 5.0 K의 범위에 들어, 이후의 실험인 hybridization에서 충분한 양의 분자가 생산된 것이라 판단하였다(Fig. 3).

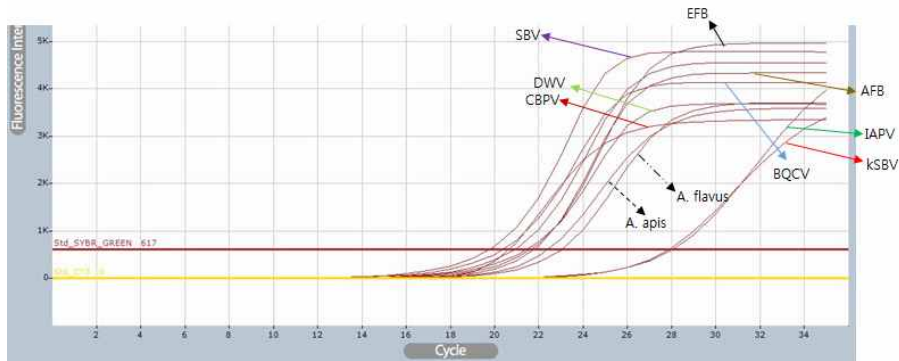


Fig 3. Multiplex PCR using 22-Asy primer mix with each pathogen-specific DNA
 As template, each 10^5 molecules of pathogen-specific DNA were added. 22-Asy primer mix were used to each PCR. The Ct values of BQCV, CBPV, DWV, SBV, AFB, EFB, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus* and *Nosema ceranae* were estimated 20.0-23.0 cycles, except 28.0 cycles of IAPV and kSBV. All final fluorescence intensities were pointed on 3.3-5.0K.

나. 꿀벌 질병 진단용 DNA chip 제작

본 연구에서 사용된 DNA chip은 K-CAPTM (K-MAC, Korea)으로, 유리봉에 실리콘 라드가 결합되어 있는 형태로, 0.2 ml PCR tube에 그대로 장착하여 PCR과 DNA 혼성화 반응을 동시에 진행할 수 있도록 고안되었다. Tube내의 유리봉 끝은 DNA 미세배열에 사용되는 지름 2.0mm의 원형 유리면이며, 미세배열의 기본 설계는 원형 유리면에 가로 7개, 세로 7개, 총 49개의 oligonucleotide probe들을 결합시킨 spot들의 배열이며, 각 spot의 지름은 0.12mm로, spot 중심간 거리 (Center to Center)는 0.18mm로 하였다. 각 probe oligonucleotide들을 별도 제작하여, 설계대로 probe들을 spotting하여 DNA-chip을 제작하였고, spot들의 위치를 영상으로 파악할 수 있도록 위치 표시(HC; hybridization control)의 위치를 미리 지정하였다.

사용된 spot의 수는 Set 1에서 19개, Set 2에서 19개, 위치 표시 4개로 총 42개이었으며, 11종 꿀벌 병원체에 특이한 probe 19종을, Set 1에서 20 pmole로 spotting하고, 같은 배열로 Set 2에서 40 pmole을 spotting하여, 한번의 DNA-chip실험에서 두 번의 반복 결과를 얻을 수 있도록 하였다(Fig. 4).

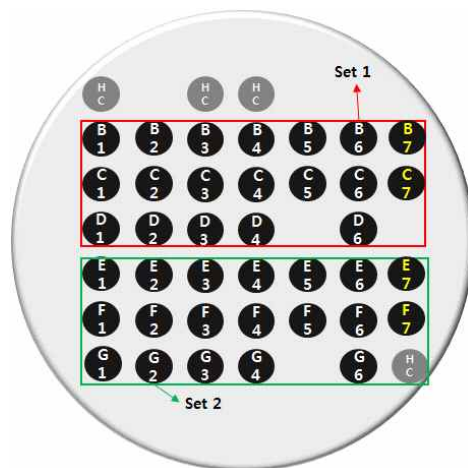


Figure 4. Positions of each spot containing oligonucleotide probes on DNA chip, K-CAPTM.

19 different oligonucleotide probes were mounted on spots in each set. Different quantities of oligonucleotide probes were used on spots in Set 1 (20 pmole) and on spots in Set 2 (40 pmole), 4 positions of Hybridization control (HC) were located.

11종 꿀벌 주요병원체에 대한 특이 oligonucleotide probe의 수는 총 19종으로 각 병원체의 유전자 변이성 등을 고려하여 복수의 probe들을 적용하였다. SBV와 kSBV의 경우 각 3종, 2종의 다른 특이 probe를 spotting하였으며, DWV, IAPV, AFB, EFB의 경우 각 2종의 특이 probe를, BQCV, CBPV, *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus* 들은 각 1종의 특이 probe를 탑재하였다(Table 4).

다. 꿀벌병원체 11종의 특이 DNA에 대한 Multiplex PCR/ DNA-chip의 적용

Paenibacillus larvae (AFB), *Melissococcus plutonius* (EFB), *Nosema ceranae*, *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus*, SBV, kSBV, DWV, IAPV, BQCV, CBPV의 11종 꿀벌 병원체 특이 DNA를 주형으로 사용하여 표준조건에 의한 표준검사를 수행하였다. 표준조건은 10⁵분자의 DNA를 PCR주형으로, 22-Asy primer mix를 사용하여 PCR을 진행하고, 이를 DNA-chip에 4시간 혼성화를 진행한 후 세척과정을 거쳐 영상분석하는 것이다.

22-Asy primer mix를 사용한, 각 병원체 특이 multiplex PCR 산물들은 바로 DNA-chip상의 특이 probe들과 hybridization시켰으며, 각 특이 PCR산물에 따라 특징적인 형상을 보여주었다 (Fig. 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)

Table 4. Positions and names of oligonucleotide probes on DNA chip, K-CAPTM

Spot site		Probe oligonucleotides	Probe concentration / spot		Genbank accession No.
Set	Set		Set 1 (pmole)	Set 2 (pmole)	
1	2				
B1	E1	BQCV-PP2-R	20	40	EF517515
B2	E2	CBPV-PP1-F	20	40	EU122231
B3	E3	DWV-PP2-F	20	40	NC004830
B4	E4	DWV-PP4-F	20	40	NC004830
B5	E5	IAPV-PP5-F	20	40	NC009025
B6	E6	IAPV-PP6-R	20	40	NC009025
B7	E7	Apis-PP4-R	20	40	D63696
C7	F7	Apis-PP5-R	20	40	D63696
C1	F1	SBV-SPP3-F	20	40	AF092924
C2	F2	SBV-SPP5-F	20	40	AF092924
C3	F3	SBV-SPP6-F	20	40	AF092924
C4	F4	KSBV-PP1-F	20	40	HQ322114
C5	F5	KSBV-PP3-F	20	40	HQ322114
C6	F6	Nosema-PP1-F	20	40	U85263
D1	G1	AFB-PP1-F	20	40	X75751
D2	G2	AFB-PP3-F	20	40	X75751
D3	G3	EFB-PP1-F	20	40	M83264
D4	G4	EFB-PP3-F	20	40	M83264
D6	G6	flavus-PP3-R	20	40	DQ486027
Total Probe oligonucleotides					
19					



Figure 5. The fluorescence image and signal intensity of *Paenibacillus larvae* detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The 4.94×10^5 molecules of AFB-specific DNA were used and 22-Asy primer mix and HC primer were added. The AFB specific D1 (probe set 1, 20pmole) and G1 (Probe set 2, 40pmole) were 9.36. D2 (probe set 1, 20pmole) and G2 (probe set 2, 40pmole) were 5.4 and 5.34. HC sites were A1, A3, A4, and G7.

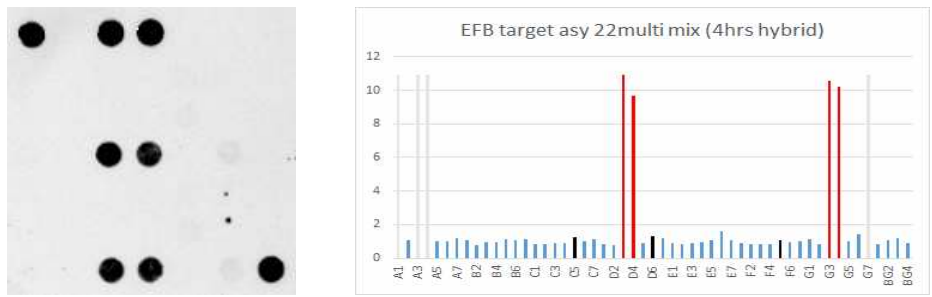


Figure 6. The fluorescence image and signal intensity of *Melissococcus plutonius* detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The EFB specific D3 (probe set 1, 20pmole), D4 (probe set 1, 20pmole) were 10.95 and 9.68. The SBR value of G3 (probe set 2, 40pmole), and G4 (probe set 2, 40pmole) were 10.56, and 10.24.

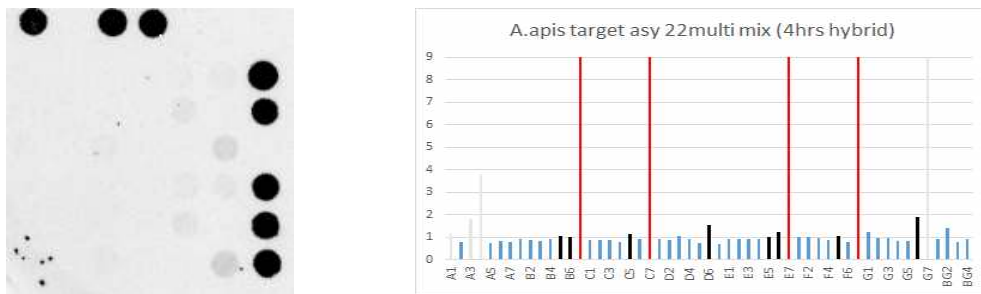


Figure 7. The fluorescence image and signal intensity of *Ascospaera apis* detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

All B7, C7, E7 and F7 of *Ascospaera apis* specific probes showed 10.99 on SBR value. B7 and C7 contain probe set 1 (20 pmole). E7 and F7 contain probe set 2 (40 pmole).

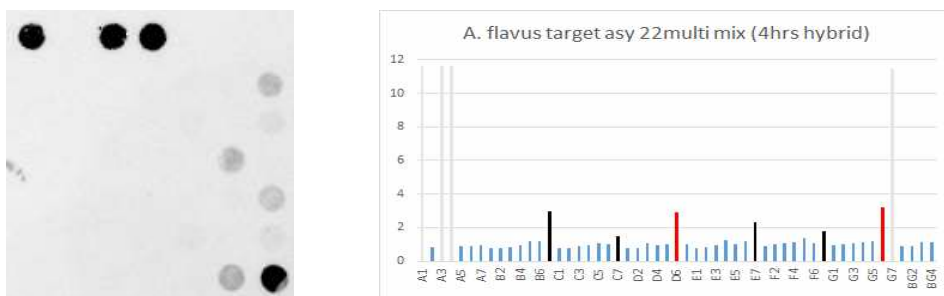


Figure 8. The fluorescence image and signal intensity of *Aspergillus flavus* detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The *Aspergillus flavus* specific probe D6 (probe set 1, 20 pmole) and G6(probe set 2, 40 pmole) were 2.91 and 3.23.

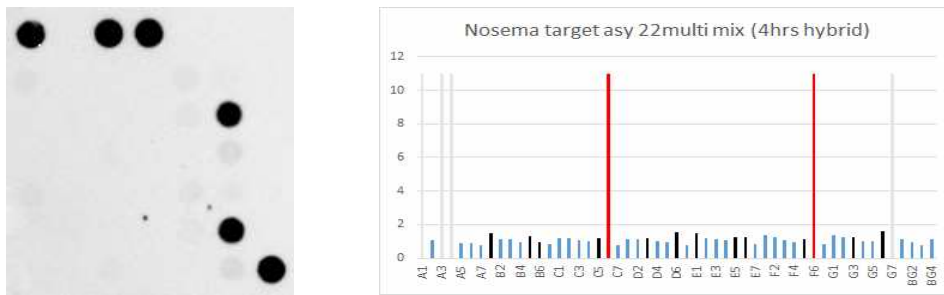


Figure 9. The fluorescence image and signal intensity of *Nosema ceranae* detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

Both specific probes C6 (probe set 1, 20pmole) and F6 (probe set 2, 40pmole) of *Nosema ceranae* were 10.98.

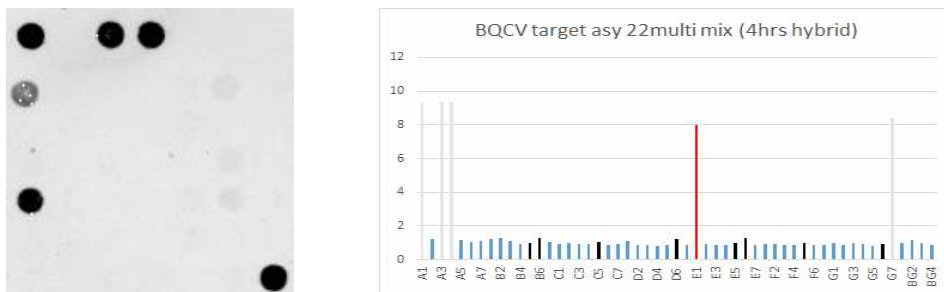


Figure 10. The fluorescence image and signal intensity of BQCV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The E1 (probe set 2, 40pmole) of BQCV specific probe showed 7.97 on SBR value (B1 did not match up with grid in software program).

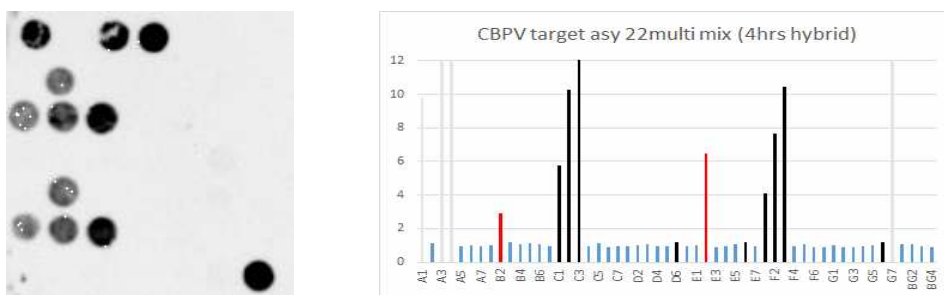


Figure 11. The fluorescence image and signal intensity of CBPV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The B2 (probe set 1, 20pmole) and E2 (Set 2, 40pmole) of CBPV specific probe showed 2.93 and 6.45.

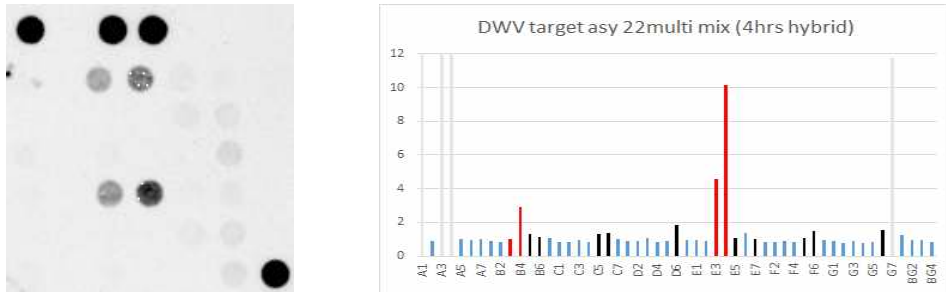


Figure 12. The fluorescence image and signal intensity of DWV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The E3 and E4 of DWV in probe set 2 (Set 2, 40pmole) showed 4.56 and 10.13 (B3 and B4 did not match up with grid).

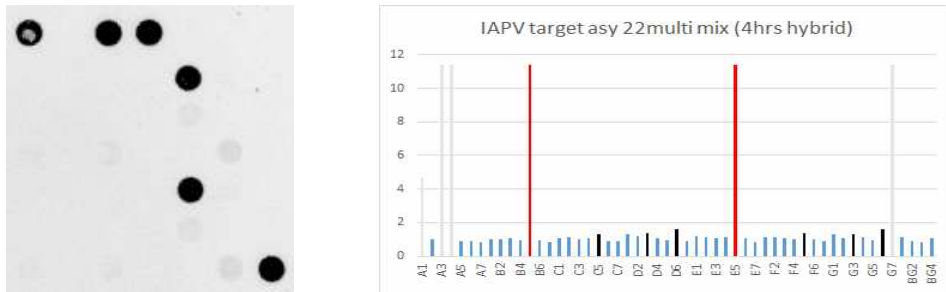


Figure 13. The fluorescence image and signal intensity of IAPV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

Both B5 (probe set 1, 20pmole) and E5 (probe set 2, 40pmole) value of IAPV specific probes were 11.42.

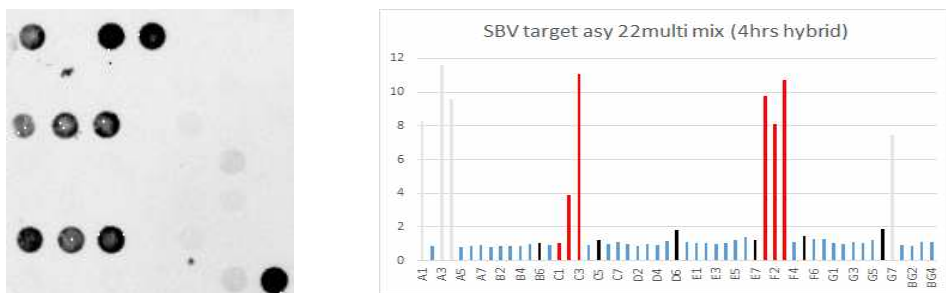


Figure 14. The fluorescence image and signal intensity of SBV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The SBV specific C2 and C3 in probe set 1 (20pmole) were 3.88 and 11.1. F1, F2, and F3 in porbe set 2 were 9.79, 8.13, and 10.72.

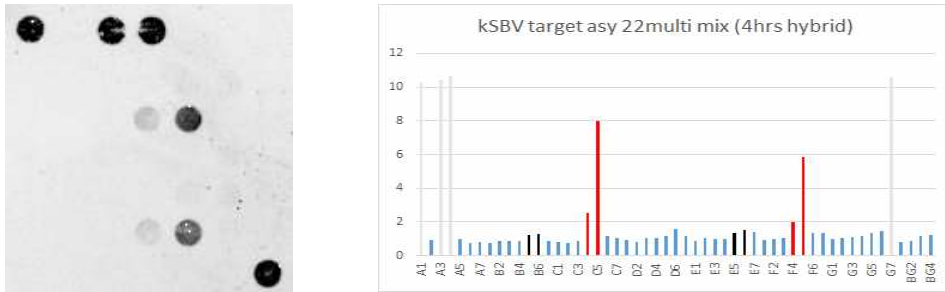


Figure 15. The fluorescence image and signal intensity of kSBV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

The kSBV specific C5 (probe set 1, 20pmole) and F5 (probe set 2, 40pmole) were 8.01 and 5.83.

라. DNA chip 진단의 현장 적용

정립한 표준조건을 따라 kSBV 감염 시료의 표준 정성 검사를 수행하였다. 감염시료는 주형으로 1.97×10^6 분자 수를 사용하였고, 22-Asy primer mix를 사용하여 기존 kSBV 특이적 증폭 band와 동일한 band를 확인하였다. 이를 DNA-chip에 적용하여 4시간 혼성화를 진행한 후 세척과정을 거쳐 DNA-chip의 영상을 분석하였다.

영상은 kSBV에 특이적인 probe들의 위치에서 현장시료의 multiplex PCR 산물들이 hybridization된 것을 인지되었으며, 일부 다른 병원체 probe들과의 반응이 또한 인지되나, 각 병원체에 대한 반응 특성에 모두 불일치하여, 최종적으로 kSBV 검출을 판정할 수 있었다. (Fig. 16).

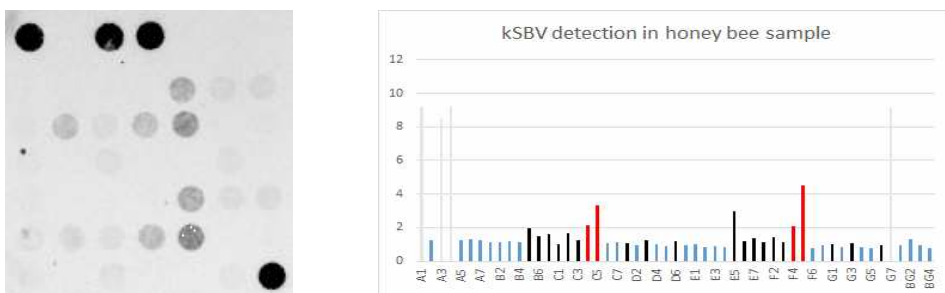


Figure 16. The application of DNA chip detection using kSBV-infected honey bee sample

cDNA was used $1\mu\text{l}$ (total $20\mu\text{l}$ cDNA generation). The C5 and F5 of kSBV specific probes showed 3.35 and 4.52 on SBR value.

4. 결론 및 요약

DNA-chip 검출 분석은 형광 염료가 표지된 multiplex PCR 산물이 DNA chip 표면의 oligonucleotide 에 결합하며 특정 파장에서 나타나는 형광의 강도를 기준으로 한다. hybridization과 세척의 효율은 본 검출법의 중요한 요소이며 hybridization 온도, 세척액 농도, 세척 과정 중 진동 조건의 영향을 각각 확인하였다. 그 결과 hybridization 온도는 52℃, 세척액 조성은 4x SSC buffer, 진동 조건은 진동이 있는 것이 각기 유리한 결과를 보였다. 특히, asymmetric primer와 hybridization 시간은 hybridization의 효율 개선에 있어 상당한 영향을 나타내었다. 각 병원체의 asymmetric primer 결과를 종합하였을 때, 평균 3.82배 SBR값 증가율을 보였고 11종 병원체 검출에 적합한 22-Asy primer mix를 확정하였다. 또한 4시간 hybridization은 1시간 hybridization에 비해 최저 117.51%, 최대 391.25% 증가하였고, 이에 표준 hybridization 시간 조건을 4시간으로 제시하였으나, hybridization 2시간에서도 결과를 보여 실험자의 판단에 따라 2시간 또는 1시간의 hybridization에 의한 분석도 가능할 것으로 예상된다.

본 연구에서 DNA-chip은 oligonucleotide probe 선정, 퇴출, 재선정 및 형광 민감도 개선, 교차 반응 개선 과정 등을 거쳐 oligonucleotide들이 선정되었고 multiplex PCR 조건 및 실험 표준조건이 확립되어 최종 개발되었다. 꿀벌 병원체 검출에 있어 대부분 특정 병원체의 정량적 검출법 연구가 넓게 진행되었고, 이제까지 여러 병원체를 통합적으로, 정성적으로 검사하는 방법은 몇 개의 multiplex PCR 혹은 특정 병원체 검출법을 종합하여 진행되었다. 그러나 본 검출법은 한 번의 검사로 꿀벌병원체 정성검사를 할 수 있는 최초의 multiplex PCR 및 DNA-chip검출법으로, 진단시료 주형에서 검출을 검증함으로써 실제 진단법으로써 효용성을 보여주었다.

한편, reverse transcription을 multiplex PCR과 DNA-chip에 도입하여 One-step DNA chip 검출을 추구하는 것은 실험자의 편의를 증대하는 하나의 플랫폼이 될 것이며 reverse transcription, multiplex PCR, hybridization까지 한 번에 진행함으로써 오염의 위험을 줄일 수 있을 것이다. 또한 비특이적 반응을 일으키는 CBPV와 SBV간 그리고 *Asocphaera apis* 와 *Aspergillus flavus* 간의 반응을 개선시킬 수 있는 새로운 primer와 oligonucleotide를 제시함으로써 혼합 감염에 대한 진단을 개선할 수 있으며, 질병 확정 검사로써 도입하고자 할 때 최소 검출 한계, 최단 검출 시간 등의 평가 기준에 있어 진보된 진단법을 제시할 수 있을

것이다. 꿀벌 병원체 multiplex PCR 및 DNA-chip 검출법은 지속적인 개발을 통해 진화할 것이며, 꿀벌에 국한되지 않고 다양한 분야의 검출에서 연구를 확장할 수 있을 것으로 기대된다.

제 6 절 꿀벌 6종 병원체에 대한 초고속 다중 PCR 검출법의 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 32(1): 27-39 (2017)에 Development of Ultra-Rapid Multiplex PCR Detection against 6 major Pathogens in Honeybee의 제목으로 발표된 것임>

1. 서 론

꿀벌은 수만의 개체가 제한적 공간에 밀집하여 생활한다는 특성을 가지며, 그만큼 각종 전염병에 노출될 가능성이 매우 높다. 현재까지 알려진 꿀벌의 질병 중 국내 양봉에 큰 영향을 미친 세균성 또는 진균성 질병의 주요 병원체들은 미국부저병 (American Foulbrood, AFB)의 *Paenibacillus larvae*와 유럽부저병 (European Foulbrood, EFB)의 *Melissococcus plutonius*, 백목병 (Chalkbrood, CB)의 *Ascosphaera apis*, 석고병 (Stonebrood, SB)의 *Aspergillus flavus*, 그리고 노제마병 (Nosemosis)의 원인균인 *Nosema apis*와 *Nosema ceranae*가 있다.

유 등 (2009)의 국내 꿀벌 질병 발생 빈도에 대한 조사에서, 2009년 국내에서 수집된 꿀벌의 질병 시료 중 58.8 %가 미국부저병에 감염되어 있었으며, 노제마병 42.9 %, 석고병 24.9 %, 백목병 12.9 %의 순으로 나타났다. 또한 농림축산검역본부의 2015년도 꿀벌질병 발생 현황은 석고병 66.5 %, 노제마병 23.3 %, 유럽부저병 15.5 %, 백목병 10.6 %, 미국부저병 4.6 % 으로 나타났으며, 이는 접수된 꿀벌 질병시료에서 *P. larvae*, *M. plutonius*, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus*, 그리고 *Nosema apis*와 *Nosema ceranae*들은 주요 세균성 및 진균성 병원체로 파악되고 있다. 또한 이들 질병은 국내뿐 아니라 국외에서도 발병률과 재 발병률의 조사에서 주요 문제로 언급되고 있으며 (Roetschi *et al.* 2008; Wilkins *et al.* 2007), 특히 *Nosema ceranae*의 경우 2016년 뉴질랜드에서 처음으로 그 존재가 새로이 발견되기도 하였다 (Frazer *et al.* 2016).

한편, 꿀벌 병원체에 대한 유전자 검사법은 주로 개별 병원체 진단을 목적으로 개발되어 왔으며, 이는 특히 유전자의 검출과 검량에 집중되어 왔다. 꿀벌 특정 병원체에 대한 일반 PCR 검출법 (Van Nguyen *et al.*, 2010; 유 등, 2007; 강 등, 2008), 병원체의 정량적 검출을 목적으로 하는 정량 PCR법 (유 등, 2008a; 유 등, 2008b; 유 등, 2010), 짧은 시간 내 병원체의 빠른 검출을 위한 초고속 PCR법 (Yoo *et al.*, 2011; Lim and Yoon, 2013; Luong *et al.*,

2015), 그리고 현장 적용성을 강화한 현장 초고속 검사법 (Ultra-fast PCR; UF-PCR)과 고리매개 증폭법 (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)이 꿀벌 질병 진단법으로 개발되어 왔다(Lim, 2013; Lee *et al.*, 2016; 왕 등, 2016a). 하지만 이러한 검출법들은 개별 혹은 2개 병원체에 대한 PCR 검사와 진단에 초점이 맞추어져 있으며, 다양한 병원체에 대한 일련의 검색을 위하여 특이 PCR 검사들을 각각 수행 하여야 하는 불편함을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 꿀벌 병원체 개체에 대한 개별 진단의 한계를 넘어, 6종의 주요 세균성 또는 진균성 꿀벌 병원체에 대하여 종합적 정성/정량 검사가 가능한 PCR-chip을 디자인 하였으며, 제작된 PCR-chip을 기반으로 진단 시간을 최소화한 초고속 동시 진단법을 개발하고자 하였다. 이는 실험실 검사와 현장 검사의 상황에서 초고속 동시 진단이 가능한 ultra-rapid real-time PCR system을 사용하였으며, 목적 유전자 산물의 증폭 시작점을 실시간으로 인지하고 증폭 유무를 melting temperature (T_m)를 통해 판단할 수 있게 하였다. 이로써 꿀벌의 주요 6종 병원체의 특이 유전자 검사를 하나의 PCR-chip을 이용하여 동시에 수행할 수 있는 초고속 진단법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 수집과 꿀벌 성분 및 유충의 핵산 순수 분리

꿀벌 유충 시료는 2016년 7월 경기대 양봉장에서 질병에 감염되지 않은 건강한 시료를 채집하여 사용하였다. 채집한 유충 시료는 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관 하였으며, 핵산의 분리는 Patho Gene-spinTM DNA, RNA extraction kit (iNtRON Co., Ltd, Korea)를 사용하여 DNA를 순수분리 하였다. 분리한 핵산은 Biophotometer (Eppendorf Co., Ltd, Germany)를 사용하여 정량한 후, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 실험에 사용하였다.

나. 꿀벌 병원체의 특이 유전자와 꿀벌 housekeeping 유전자

사용한 꿀벌과 꿀벌 병원체 특이 유전자 재조합 DNA들은, 경기대학교 생명과학과 분자생물학 실험실에 확보된 것으로, 각 재조합 DNA들을 각 병원체의 유전자 정보들과 비교하여 각각 특이 염기서열이 존재함을 확인하였으며, 각각의 유전자 정보 및 참고문헌은 Table 1과 같다.

Table 1. The recombinant DNAs of 6 honeybee pathogens and β -actin gene

Pathogens/gene	Diseases	GenBank accession No.	Gene Information	Reference
<i>Paenibacillus larvae</i>	American Foulbrood	U85263	16S rRNA	왕 등, 2016b
<i>Melissococcus plutonius</i>	European Foulbrood	X75751	16S rRNA	하 등, 2005
<i>Melissococcus plutonius</i>	European Foulbrood	AP012200	DNA gyrase subunit B	Van Nguyen <i>et al.</i> , 2012
<i>Ascospaera apis</i>	Chalkbrood	M83264	18S rRNA	이 등, 2004
<i>Aspergillus flavus</i>	Stonebrood	D63696	18S rRNA	Lee <i>et al.</i> , 2015
<i>Nosema apis</i>	Nosemosis	U97150	16S rRNA	Lim <i>et al.</i> , 2014
<i>Nosema ceranae</i>	Nosemosis	DQ486027	16S rRNA	왕 등, 2016b
β -actin	Housekeeping gene	AB023025	mRNA	Unpublished

다. 6종 꿀벌 질병 진단을 위한 PCR-chip용 프라이머

6종의 꿀벌 병원체 진단을 위해 16S rRNA (*P. larvae*, *M. plutonius*, *N. ceranae*), DNA gyrase subunit B (*M. plutonius*), 18S rRNA (*A. apis* 와 *A. flavus*)와 small subunit ribosomal RNA (*N. apis*)의 특이 염기서열에서 ultra-rapid multi-PCR (UR-multi-PCR)용 프라이머 쌍을 선정하였으며, 꿀벌 핵산의 유무와 PCR 반응의 판별을 위한 대조군으로 사용하기 위하여 housekeeping 유전자인 β -actin 프라이머 쌍을 설계하였다 (Table 2). 또한 본 프라이머 쌍들은 Table 1의 재조합 DNA의 특이 염기서열에 근거하여 설계하였으며, 프라이머의 합성은 Bionics사 (Korea)에 의뢰 합성하였다.

라. 6종 병원체 프라이머 쌍에 대한 목적 유전자의 검출 한계

각 꿀벌 병원체의 특이 유전자 재조합 DNA 주형 (Table 1)을 10^6 copies에서 10^0 copies DNA 까지 연속 희석하여 초기 주형량에 따른 검출 한계를 확인하였다. Multi-PCR은 GENECHECKER (GENESYSTEM Co., Ltd, Korea)에서 Rapi:Chip (GENESYSTEM Co., Ltd, Korea)을 사용하여 수행하였으며(왕 등, 2016a), 각 well은 $5 \mu\text{l}$ 의 $2 \times$ Rapi mix (GENESYSTEM Co., Ltd, Korea)와 $1 \mu\text{l}$ 씩의 각각의 forward 와 reverse 병원체 특이 프라이머 쌍(각 최종 농도 $1\mu\text{M}$)과 $1\mu\text{l}$ 의 연속 희석한 재조합 DNA로 총 $10 \mu\text{l}$ PCR 반응액으로 조성하였다. Multi-PCR 반응은 95°C 초기 변성 30초, 95°C 변성 4초, 52°C 중합 4초, 72°C 신장 4초로, 총 40회전 또는 50 회전 수행하였다.

Table 2. Primer sets of 6 honeybee pathogens and β -actin primer set for UR-multi-PCR

Name of species (Target gene)	Name of primers	Sequence(5'→3')	Reference
<i>Paenibacillus larvae</i> (16S rRNA)	AFB-DC-F1 AFB-DC-R1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA TCCTCTCCTACACTCAAGTCTCC	왕 등, 2016b
<i>Melissococcus plutonius</i> (16S rRNA)	EFB-DC-F1 EFB-DC-R1	AAGAGTAACTGTTTTCTCTCG TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	왕 등, 2016b
<i>Melissococcus plutonius</i> (DNA gyrase subunit B)	EFB-PC-F1 EFB-PC-R3	GCGAATGAAGAAATTCGTTCA GTTGGGCAATATAAACATACCCA	This study
<i>Ascospaera apis</i> (16S rRNA)	AA-DC-F1 AA-DC-R1	ATCGGGCGGGCTTTAACTA TCTGGACCTGGTGAGTTTCC	왕 등, 2016b
<i>Aspergillus flavus</i> (16S rRNA)	AF-DC-F1 AF-DC-R1	GAACGAGACCTCGGCCCTT GGGTTTAACAAGATTACCCGACC	왕 등, 2016b
<i>Nosema apis</i> (16S rRNA)	NoA-F3(179) No-R2	TAACAATGTAGTCGTTATTAGC TACCACACAGTTCGATTGGTC	This study Lim <i>et al.</i> , 2014
<i>Nosema ceranae</i> (16S rRNA)	No-DC-F2 No-DC-R1	GGTAATGGCTTAACAAGGCTGTGA CCTCATATTGCTTCTTAAAAAATAAA C	왕 등, 2016b
Honey bee (β -actin)	β -actin151-F β -actin151-R	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG GACCCACCAATCCATACGGA	Yang and Cox-. Foster 2005

마. 질병 진단을 위한 최적 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립

진단에 적합한 꿀벌 애벌레의 핵산 사용량을 확립하기 위하여, 꿀벌 애벌레에서 추출한 핵산을 주형으로 β -actin 유전자의 증폭량을 확인하였다. PCR 반응은 5 μ l의 2 \times Rapi mix와 1 μ l 씩의 β -actin 151-F (최종 농도 1 uM)와 β -actin 151-R (최종 농도 1 uM) 프라이머에 꿀벌 애벌레의 핵산 (최고 1 μ g에서 최저 1 ng 까지 희석), 총 10 μ l로 조성하여 수행했으며, 이때의 positive control로써 1.48×10^5 copies의 β -actin 유전자를 포함하는 재조합 DNA를 사용하여 β -actin PCR 산물의 합성 유무와 특히 Tm값을 비교하였다. Multi-PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C 초기변성 30초, 95 $^{\circ}$ C 변성 4초, 52 $^{\circ}$ C 중합 4초, 72 $^{\circ}$ C 신장 4초로, 총 40회전 수행하였다.

바. 꿀벌 genomic DNA 존재 시 6종 병원체 프라이머 쌍에 대한 목적 유전자의 검출 한계

12종병원체(Black queen cell virus, Chronic bee paralysis virus, Deformed wing virus, Israeli acute paralysis virus, Sacbrood virus, Korean sacbrood virus, *Paenibacillus larvae*,

Melissococcus plutonius, *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus*, *Nosema apis*, *Nosema ceranae*)의 존재를 확인한 실시간 PCR의 결과에서 어떠한 병원체도 검출되지 않은 꿀벌 애벌레의 핵산 50 ng과 6종 병원체의 각각의 재조합 DNA 주형을 10^6 copies에서 10^0 copies DNA 까지 연속 희석 하여, 각 well당 5 μ l의 2 × Rapi mix와 1 μ l 씩의 각각의 forward 와 reverse 병원체 특이 프라이머 쌍과 총 10 μ l PCR 반응액으로 조성하였다. Multi-PCR 반응은 95 °C 초기변성 30초, 95 °C 변성 4초, 52 °C 중합 4초, 72 °C 신장 4초로, 총 40회전 수행하였다.

사. 6종 질병 초고속 진단을 위한 최적 프라이머 농도

각 질병의 진단 민감도를 높이기 위한 최적 프라이머 농도를 확립하기 위하여, 각 병원체에 해당하는 프라이머는 최종 농도를 4 μ M, 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 500 nM, 250 nM 로 조절하여 multi-PCR을 진행하였다. 각 well 당 총 10 μ l로 조성하였으며 꿀벌 애벌레의 핵산 50 ng에 각 병원체의 특이 재조합 DNA를 1×10^5 copies로 하여 5 μ l의 2 × Rapi mix와 위의 각기 다른 프라이머 쌍의 농도로 multi-PCR 반응을 수행하였다. Multi-PCR 반응은 95 °C 초기변성 15초, 95 °C 변성 4초, 52 °C 중합 4초, 72 °C 신장 4초로, 총 40회전 수행하였다.

아. 6종 질병 초고속 진단을 위한 최적 혼성 온도

UR multi-PCR에서 각 병원체 민감도를 높이기 위한 최적 혼성 온도의 확립을 위하여, 52 °C - 66 °C 범위에서 측정되는 Ct값을 온도별로 비교 분석하였다. 각 well 당 총 10 μ l로 조성하였으며 꿀벌 애벌레의 핵산 50 ng에 각 병원체의 특이 재조합 DNA 10^5 분자와 각각의 병원체의 최적의 forward 와 reverse 특이 프라이머 농도를 적용하여 multi-PCR을 95 °C 초기변성 15초, 95 °C 변성 4초, 52 °C - 66 °C 중합 4초, 72 °C 신장 4초로, 총 40회전 조건으로 수행하였다.

자. 꿀벌 6종 질병 초고속 다중 PCR의 최소 검출 시간 및 검출 한계 확립

6종 꿀벌 질병의 최적 및 최소 검출 시간을 확립하기 위하여, UR multi-PCR의 각 단계에서 초기변성은 95 °C에서 15초로, PCR step 중 변성시간은 1초로 설정하였으며, 중합은 앞선 실험의 최적의 온도 조건에서 서로 다른 시간조건 3초, 2초 또는 1초로 하였고, 신장은

72 °C, 3초로 설정하여 40회전으로 진행하였다. 사용된 PCR 조성은 총 반응액 10 μ l에 5 μ l의 2 \times Rapi mix와 각 병원체별 최적 농도의 프라이머를 첨가하였으며, 꿀벌 애벌레의 핵산 50 ng과 재조합 DNA $10^5 - 10^3$ copies를 사용하였으며, 이때 사용한 각각의 재조합 DNA 분자는 최소 검출 시간 내에 병원체의 검출 한계를 조사하기 위함이었다.

차. 꿀벌 성체를 이용한 초고속 다중 PCR의 유효성 평가

UR multi-PCR을 통한 6종 꿀벌 병원체의 현장 적용 실험을 평가하기 위하여, 경기대 양봉장에서 채집된 감염 시료로써, *Aspergillus flavus*와 *Nosema ceranae*에 감염된 성봉에서 각기 핵산을 추출하여 PCR을 진행하였다. Patho Gene-spin™ DNA, RNA extraction kit를 이용하여 꿀벌 한 마리로부터 핵산을 추출해 내었으며, 각각 꿀벌 병원체 검사를 위한 multi-PCR은 well당 총 반응액 10 μ l로 하여 50 ng의 꿀벌 핵산이 사용되었으며, 2 \times Rapi mix와 각 병원체별 최적화된 프라이머 농도로 조성하여, 최소 검출시간 조건에 따라 진행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 6종 병원체 프라이머 쌍에 대한 목적 유전자의 검출 한계

초고속중합효소연쇄반응 (UR-PCR)에서 6종 꿀벌 병원체 프라이머 쌍에 따른 목적 유전자의 검출 한계를 측정하기 위해, 각 병원체에 해당하는 재조합 DNA를 약 1×10^6 에서 1×10^0 분자까지 연속 희석하여 이를 주형으로 하였다. *Paenibacillus larvae* 16S rRNA 유전자를 포함하는 재조합 DNA 주형의 경우, AFB-DC-F1/R1 프라이머는 최소 1.23×10^3 분자까지 검출 가능함을 확인하였고 (Fig. 1, A), 검출산물의 용점분석에서 특히 Tm (melting Temperature) 값은 88.68 ± 0.35 으로 비특이 Tm값과 극명한 차이를 보였으며, 특히 Tm값은 이들 검출산물의 유의성을 판별하는 기준이 되었다(Fig. 1, B). 또한 다른 꿀벌 병원체의 특이 유전자 (*Mellisococcus plutonius* 16S, *Mellisococcus plutonius* DNA gyrase, *Ascosphaera apis* 18S, *Aspergillus flavus* 18S, *Nosema ceranae* 16S와 *Nosema apis* 16S rRNA)와 꿀벌의 housekeeping 유전자 (β -actin)가 포함되어 있는 재조합 DNA를 사용한 중합효소 연쇄반응에서 각 프라이머 쌍에 대한 검출 한계는 각각 1.24×10^1 , 1.35×10^2 , 1.17×10^3 , 1.06×10^3 , 1.03×10^2 , 1.36×10^3 , 1.48×10^1 분자였으며 (Fig. 2, A), 또한 목적 유

전자 산물의 특정 Tm값을 통해 증폭의 유의성을 확인하였다 (Fig. 2, B).

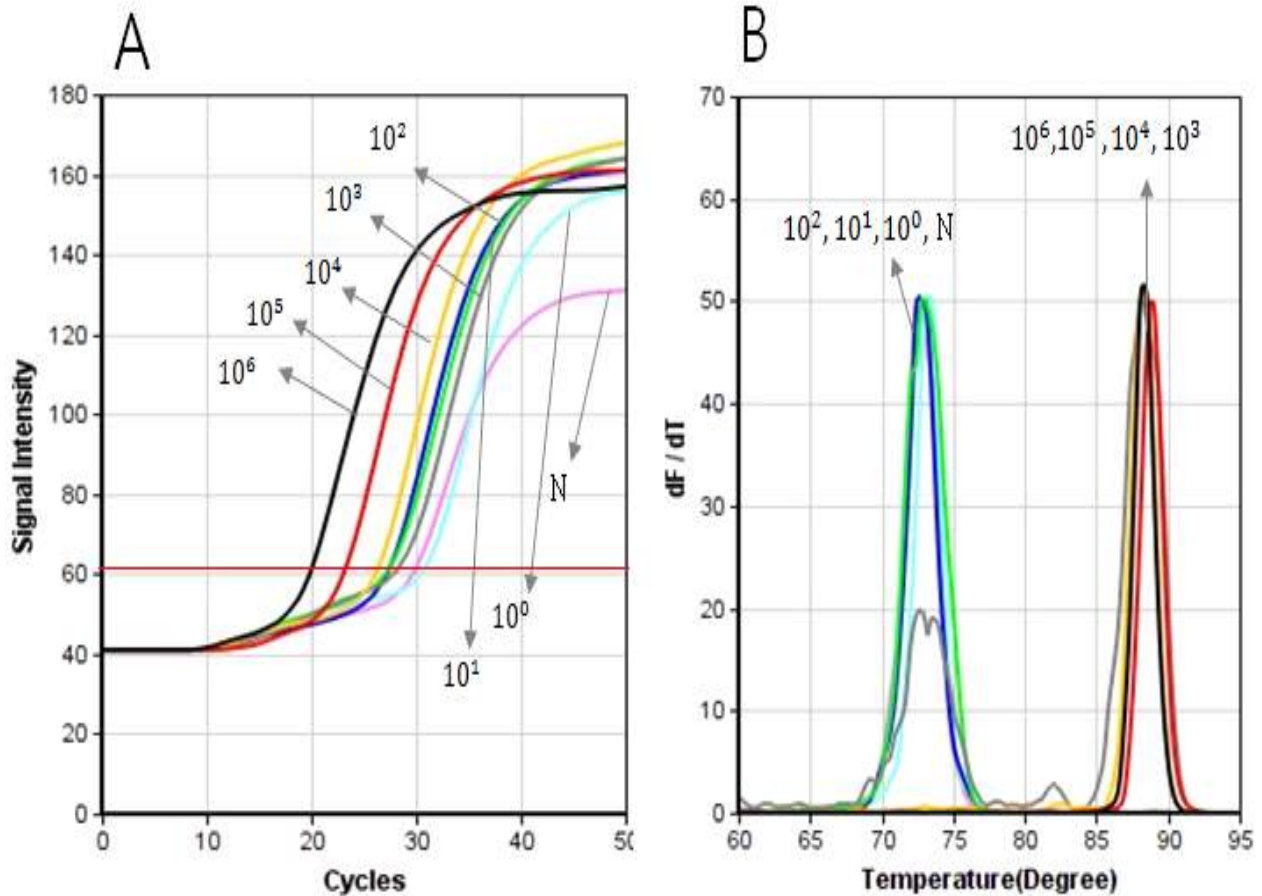
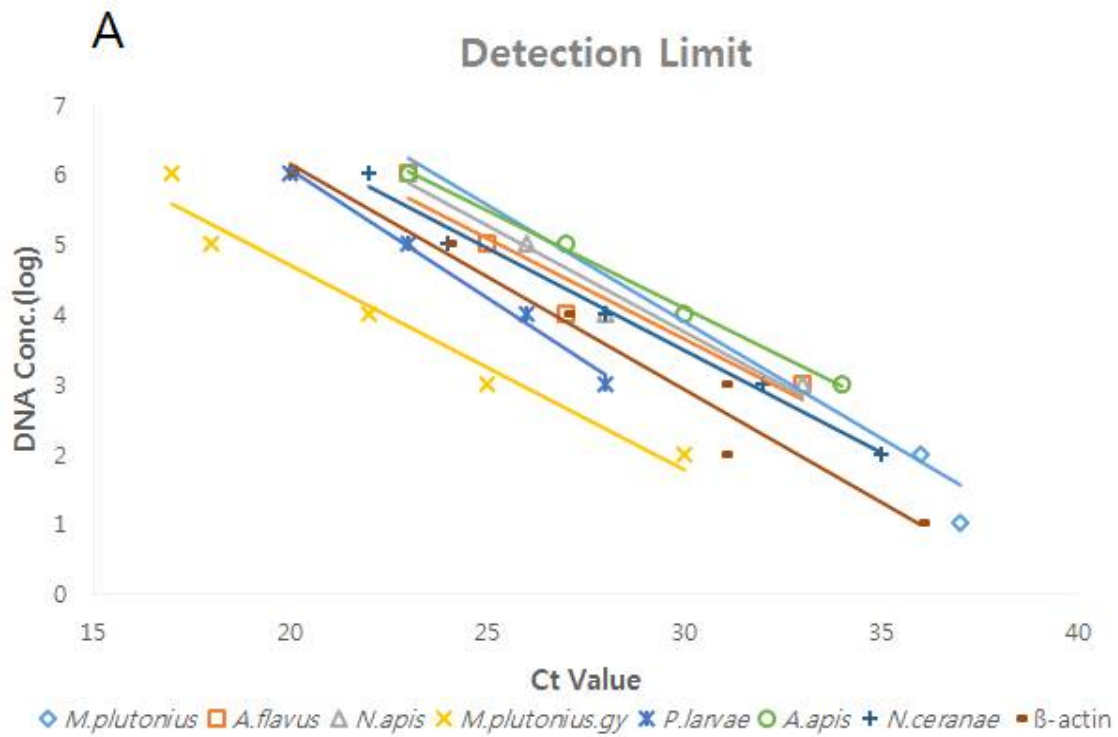


Fig.1. Specificity of PCR product according to initial templates of target gene for *Paenibacillus larvae*

Target gene of *Paenibacillus larvae* was amplified with AFB-DC-F1/R1 primer pair. Panel A is the fluorescent graph of amplified target gene according to the serially diluted initial templates. Panel B is a peak graph of Tm value. The PCR condition was 95 °C, 30 sec of pre-denaturation, 95 °C, 4 sec of denaturation, 52 °C, 4 sec of annealing, 72 °C, 4 sec of polymerization in each cycle for 50 cycles. AFB-DC-F1/R1 primers can detect 1.23×10^3 copies of recombinant plasmid inserted with *Paenibacillus larvae* 16S rRNA.



B

Pathogen	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutonius</i>	<i>M.plutonius.gyrase</i>	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>	β -actin
Detection limit	1.23×10^3	1.24×10^1	1.35×10^2	1.17×10^3	1.06×10^3	1.03×10^2	1.36×10^3	1.48×10^1
Range of positive Tm value	88.68±0.35	87.13±0.35	80.50±0.32	87.25±0.36	89.48±0.34	81.93±0.65	79.13±0.73	81.79±0.84

Fig. 2. Ct value and detection limit according to initial templates of target gene

Panel A showed the Ct value of each pathogens according to the initial templates and positive amplifications were classified with considering the Tm values of them (*gy : DNA gyrase). Panel B revealed the detection limit of each primer pairs and range of positive Tm values of each pathogen.

나. 질병 진단을 위한 최적 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립

병원체 감염 시료의 초기 총 핵산을 최소화하는 것은 시료로부터 병원체 특이 유전자를 검출해 내는데 있어 불리하며 또한 과도한 핵산의 존재 역시 증합효소 연쇄반응에 영향을 주기 때문에 진단에 적합한 꿀벌 핵산의 범위를 정하는 것은 중요하다. UR-PCR에 적합한 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립을 위해, 게놈 DNA (genomic DNA, gDNA)는 꿀벌 애벌레 한 마리 (평균 73 mg)로부터 평균 1.59 μ g을 추출하였고, 추출한 핵산은 꿀벌의 housekeeping 유전자인 β -actin 유전자의 검출을 위해 각각 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 1 ng을 반응에 사용하였다. β -actin 유전자 증폭 형광 그래프 상에서 정규 곡선을 형성하며, 초기 형광 강도의 2배 이상의 최종 형광 값을 갖는 핵산 농도는 100 ng, 50 ng, 25 ng과 10 ng이었으며, 25 ng의 gDNA를 주형으로 하였을 때 가장 높은 최종 형광 값을, 1000 ng과 500 ng에서는 가장 낮은 형광 값을 나타내었다 (Fig. 3, A). 꿀벌 핵산 농도별 β -actin의 Tm값은 앞선 실험의 81.79 ± 0.84 범위의 유의 값에 분포하였다 (Fig. 3, B). 또한 100 ng - 25 ng의 주형에서 Ct값 24로써 가장 빠르게 측정되었으며, 이어서 10 ng과 250 ng에서 Ct값 25, 1000 ng과 500 ng에서는 Ct값이 측정되지 않았다 (Table 3). 이는 과량의 핵산 (1000 ng과 500 ng)을 사용할 경우 목적 유전자의 증폭 유무를 판단하기에 부적합함을 보여 주었다. 따라서 과량의 핵산에 의한 영향이 없으며, 병원체 유전자를 포함하는 최대의 핵산을 사용하기 위하여, 형광그래프 상에서 관측되는 정규 곡선, 최종 형광 값, 그리고 측정된 Ct값을 토대로, PCR 증폭에 최적인 꿀벌 핵산 사용량은 50 ng으로 판정하였다.

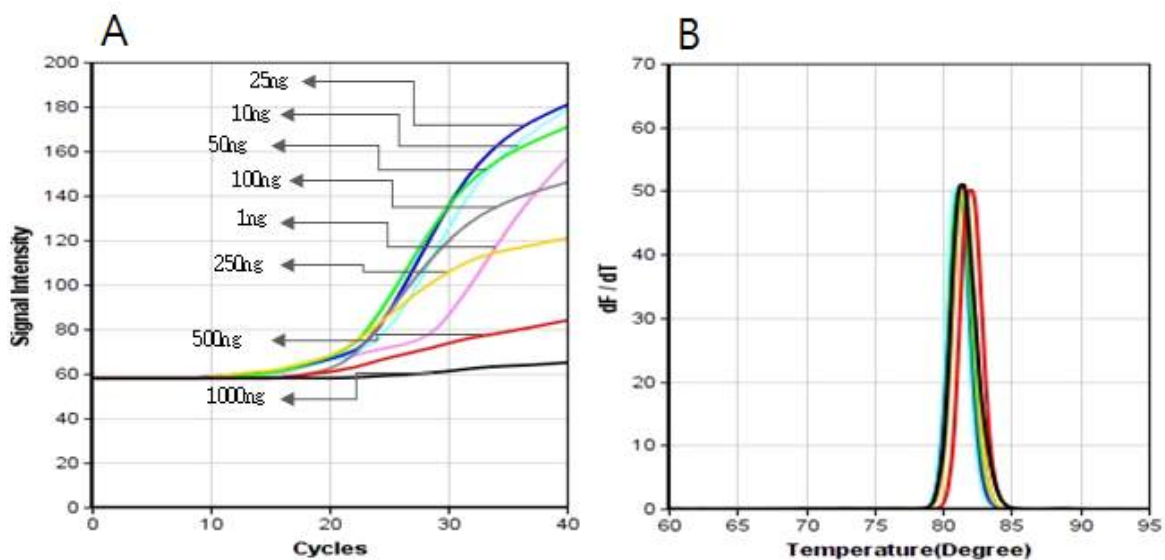


Fig. 3. The optimal condition of honey bee nucleic acid to UR-PCR

The amplification of β -actin gene was performed using 1000 - 1 ng gDNA of honeybee larvae. Panel A is the fluorescent graph of amplification according to initial gDNA and Panel B is peak graph of Tm value. The amplification of β -actin gene with 1000 ng and 500 ng initial gDNA was done poorly. Only in 100 - 10 ng gDNA as a template, the amplification curve was formed regularly and the optimal usage of gDNA was 50 ng.

Table 3. The Ct value and Tm value of β -actin gene depending on the concentration of initial templates

Amount of genomic DNA	1000 ng	500 ng	250 ng	100 ng	50 ng	25 ng	10 ng	1 ng
Ct value	0	0	25	24	24	24	25	29
Tm value	82.07	82.43	82.07	82.07	81.71	81.71	81.36	82.07

다. 꿀벌 gDNA 존재 시 6종 병원체 프라이머 쌍에 대한 목적 유전자의 검출 한계

꿀벌의 gDNA내의 각 병원체 DNA가 함께 존재할 경우 검출 한계를 확인하고자, 각 병원체에 해당하는 재조합 DNA를 1×10^8 에서 1×10^0 분자까지 연속 희석하여 50 ng의 꿀벌 gDNA와 혼합하여 이를 각각의 UR-PCR에 사용하였다. *Paenibacillus larvae* 16S rRNA 특이 프라이머쌍은 꿀벌 gDNA 존재 하에서 최소 1.23×10^3 분자까지 검출 가능하였으며 (Fig. 4, A), 이때 특이적인 증폭에 대하여 Tm은 88.95 ± 0.35 로 확인되었다 (Fig. 4, B). 이외에 *Mellisococcus plutonius* 16S, *Mellisococcus plutonius* DNA gyrase, *Ascospaera apis* 18S, *Aspergillus flavus* 18S, *Nosema ceranae* 16S와 *Nosema apis* 16S rRNA의 검색에 대하여 각각 1.24×10^3 , 1.35×10^2 , 1.17×10^2 , 1.06×10^3 , 1.03×10^2 , 1.36×10^3 의 분자까지 검출이 가능하였으며, 이때 각 Tm값의 범위는 87.16 ± 0.35 , 80.29 ± 0.50 , 87.31 ± 0.42 , 89.57 ± 0.36 , 81.80 ± 0.65 , 78.96 ± 1.26 으로 나타났으며, 이는 실전시료에서의 각 병원체별 유전자 증폭 유무를 판단하는 특이 지표로써 사용이 가능할 것이다 (Fig. 5, B).

애벌레 한 마리당 회수한 gDNA는 평균 $1.59 \mu\text{g}$ 에 해당하였고, 50 ng의 genomic DNA 존재 하에 *Paenibacillus larvae*의 16S rRNA 재조합 유전자는 1.23×10^3 의 분자까지 검출할 수 있었으므로 이를 역으로 계산($(1.59 \mu\text{g} / 50 \text{ ng}) \times \text{detection limit of each pathogen}$)하였을 때, $1.59 \mu\text{g}$ 에 해당하는 애벌레 한 마리에 3.91×10^4 copies 이상의 병원체가 있을 경우 검출이 가능한 것으로 확인하였다. 나머지 유전자 역시 애벌레 당 회수한 평균 gDNA $1.59 \mu\text{g}$ 를 기준으로, *Mellisococcus plutonius*는 3.94×10^4 , *Mellisococcus plutonius* (gyrase)는

4.29×10^3 , *Ascospaera apis*는 3.72×10^3 , *Aspergillus flavus*는 3.37×10^4 , *Nosema ceranae*는 3.28×10^3 , *Nesema apis*는 각각 4.32×10^4 copies의 병원체가 존재할 경우 검출 가능한 것으로 산출하였다.

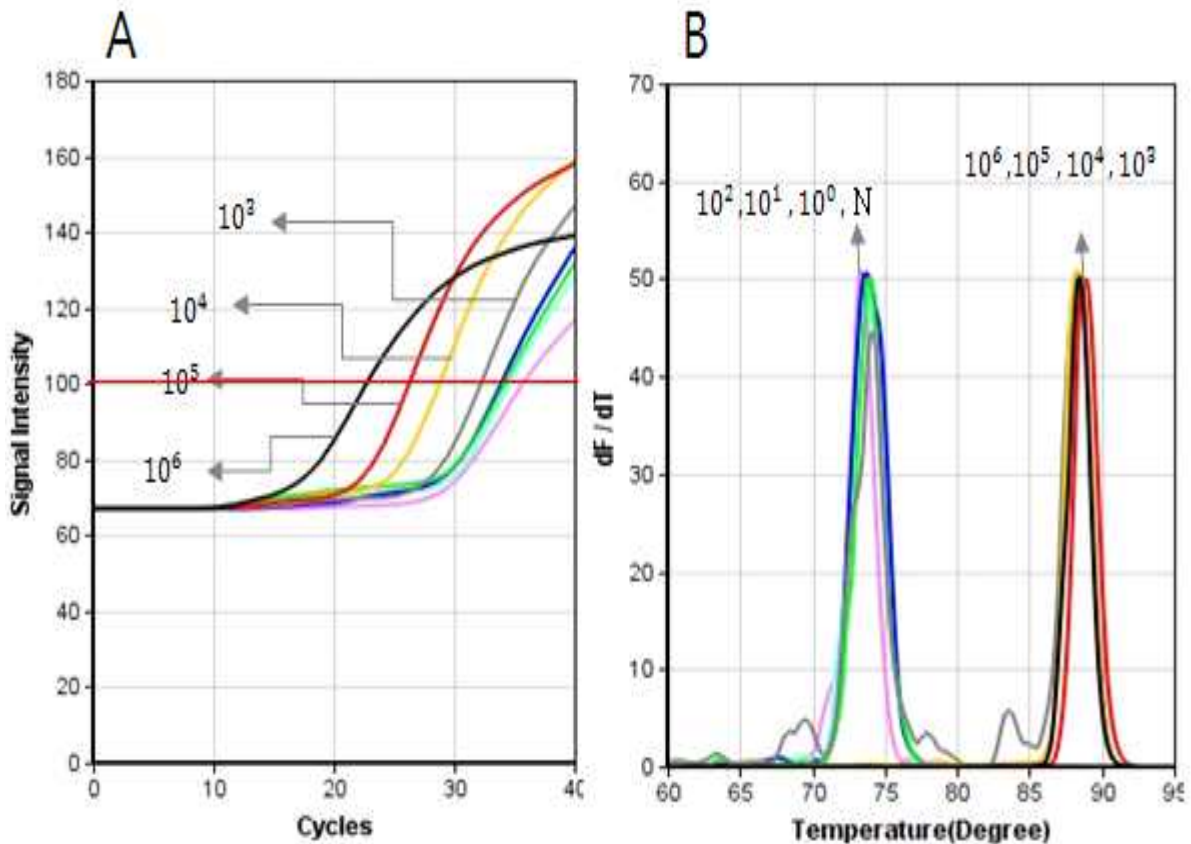
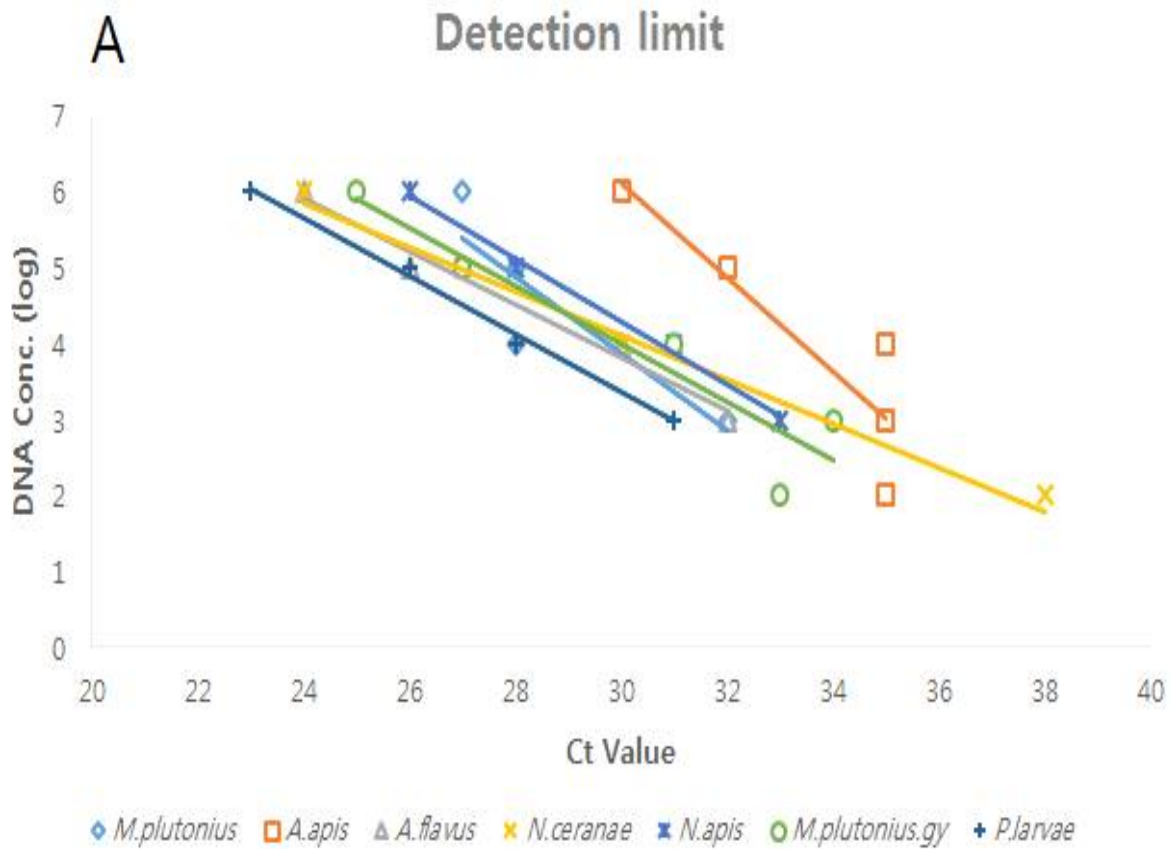


Fig. 4. Specificity of PCR product according to initial templates of target gene for *Paenibacillus larvae* mixed with honey bee gDNA.

The target gene of *Paenibacillus larvae* was amplified with AFB-DC-F1/R1 primer pair. Panel A is the fluorescent graph of amplified target gene of *Paenibacillus larvae* according to the serially diluted initial templates. Panel B is a peak graph of T_m value. The PCR condition was 95 °C, 30 sec of pre-denaturation, 95 °C, 4 sec of denaturation, 52 °C, 4 sec of annealing, 72 °C, 4 sec of polymerization in each cycle for 40 cycles. AFB-DC-F1/R1 primers (Final conc. 1 μ M) can detect 1.23×10^3 copies of recombinant plasmid inserted with *Paenibacillus larvae* gene with 50 ng genomic DNA of honeybee.



B

Pathogen	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutonius</i>	<i>M.plutonius</i> (gyrase)	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>
Detection limit	1.23×10^3	1.24×10^3	1.35×10^2	1.17×10^2	1.06×10^3	1.03×10^2	1.36×10^3
Range of positive Tm value	88.95±0.35	87.16±0.35	80.29±0.50	87.31±0.42	89.57±0.36	81.80±0.65	78.96±1.26

Fig. 5. Ct value and detection limit according to initial templates of target gene mixed with honeybee gDNA

Panel A showed the Ct value of each pathogens according to the initial templates with gDNA and positive amplifications were classified with considering the Tm values of them (*gy : DNA gyrase). Panel B revealed the detection limit of each primer pairs and range of positive Tm values of each pathogen.

라. 6종 질병 초고속 진단을 위한 최적 프라이머 농도

초고속 PCR에 적합한 6종 질병 (7종의 유전자)와 β -actin 유전자 프라이머의 최적 농도를 확립하기 위하여 최종 농도 4 μ M, 3 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 500 nM과 250 nM의 범위에서 UR-PCR반응을 진행하였다. 3회 반복 시행하여 각 농도별 측정되는 Ct값과 최종 형광 값, melting graph에서 비특이적인 그래프가 형성되지 않는 조건에서 최적 프라이머 농도를 설정하고자 하였다. 그 결과 AFB-DC-F1/R1, EFB-DC-F1/R1, EFB-PC-F1/R1, AA-DC-F1/R1, AF-DC-F1/R1은 최종 농도 2 μ M을 사용하였을 때 민감도가 가장 우수하였으며, No-DC-F2/R1와 NoA-F3(179)/No-R2는 최종 농도 4 μ M을 사용하는 것이 검출에 가장 유리하였고 또한 β -actin 151-F/R는 최종 농도 1 μ M에서도 우수한 증폭을 보였다 (Table 4).

Table 4. Ct and range of Tm value according to each concentration of 8 primer pairs

Final concentration	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutonius</i>	<i>M.plutonius</i> (gyrase)	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>	β -actin
250nM	32*(NS)	24*(NS)	28*(NS)	0(NS)	28	0(NS)	31(NS)	26
500nM	30	29	25	39	28	0(NS)	35(NS)	22
1 μ M	26	25	25	34	25	33	32	20
2 μ M	25	25	21	34	23	29	29	19*(NS)
3 μ M	25	24	22	33*(NS)	24(NS)	29	30	19*(NS)
4 μ M	24	24	17**(NS)	33**(NS)	22*(NS)	29	24	19**(NS)
Tm(°C)	88.21±0.5	86.93±0.3	80.29±0.2	86.84±0.4	89.10±0.2	81.45±0.1	78.41±0.3	81.94±0.3
	8	2	5	8	9	7	4	3

NS: non-significant signal, *: non-specific signal and **: Strong non-specific signal

마. 6종 질병 초고속 진단을 위한 최적 중합 온도

UR-PCR을 지향함에 있어 높은 중합 온도는, PCR 단계 간의 온도 상승속도와 하강속도 (Ramping time)를 줄여, 전체 반응 시간을 단축시킬 수 있는 중요 요소이다. 따라서 6종 질병 (7종의 유전자)와 β -actin 유전자의 증폭이 모두 가능한 높은 중합 온도의 검색이 요구되었다. 이에 중합 온도를 52 °C에서 66 °C까지 각기 달리하여 UR-PCR을 수행하였으며, 이들 유전자의 검출이 가능한 온도를 확인한 결과, *P. larvae* 16S, *A. flavus* 18S와 β -actin gene은 66 °C의 중합 온도 에서도 검출이 가능하였으며, 그 다음으로 *M. plutonius* 16S, *A. apis* 18S는 64 °C 그리고 *M. plutonius* DNA gyrase, *N. apis* 16S는 62 °C, *N. ceranae* 16S는 60 °C의 중합 온도 까지 증폭 가능하였다. 그리하여 본 실험에서 목적하는 UR-PCR 지향을

위해, 각각의 다른 8개 유전자의 검출이 용이한 높은 중합 온도의 설정은 동일 분자 수 (10^5 copies)에서의 Ct값 분포를 고려하여 60 °C로 설정하였다 (Fig. 6).

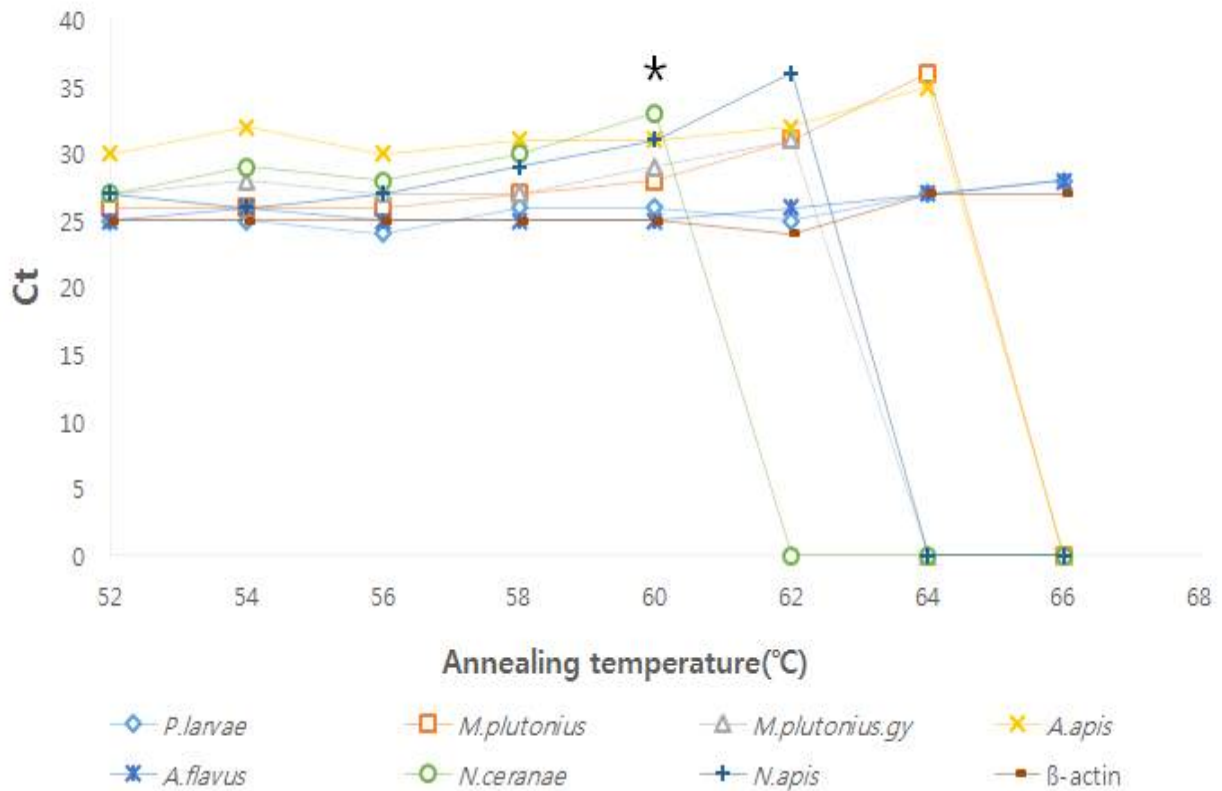
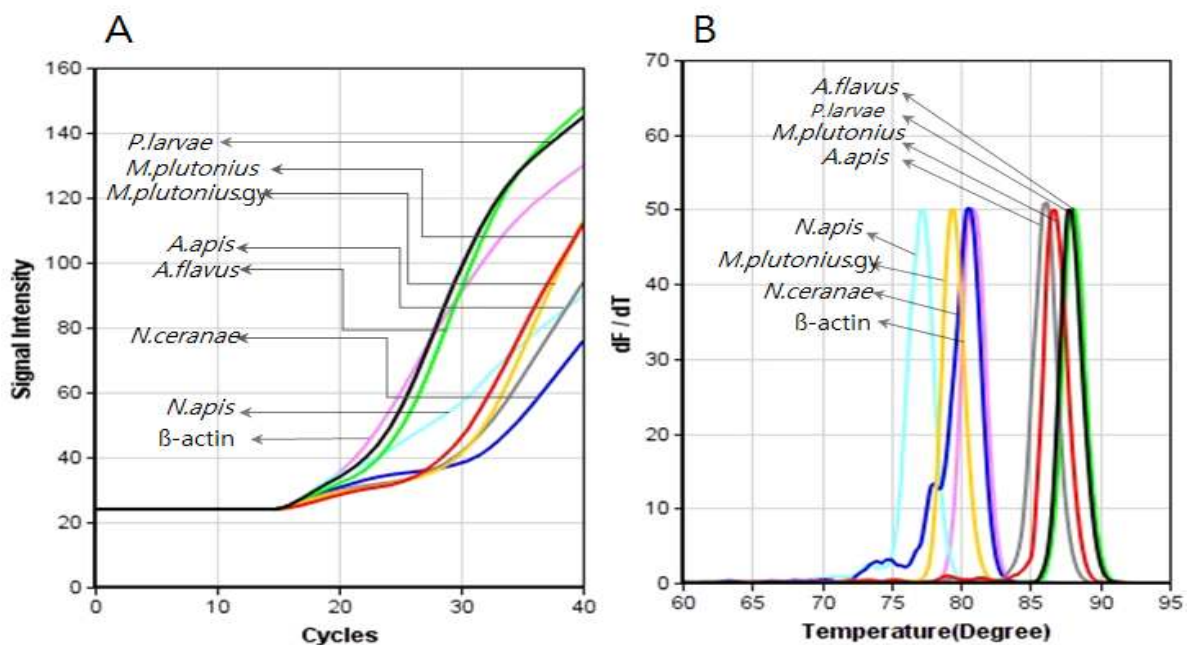


Fig. 6. The optimal annealing temperature of 6 species pathogens and β -actin gene

For confirming the optimal annealing temperature of UR multi-PCR, the annealing temperature was controlled at 52 °C to 66 °C. *Paenibacillus larvae*, *Aspergillus flavus*, β -actin gene can be detected up to 66 °C annealing temperature and *Mellisococcus plutonius*, *Ascospaera apis* gene can be detected up to 64 °C. *Mellisococcus plutonius gyrase* (gy : DNA gyrase), *Nosema apis* can be detected up to 62 °C annealing temperature and *Nosema ceranae* can be detected up to 60 °C annealing temperature. As a result, the optimal annealing temperature was 60 °C(*). 10^5 copies of DNA were used as template and the concentration of each primer pairs was based on optimal condition.

바. 꿀벌 6종 질병 초고속 다중 PCR의 최소 검출 시간 및 검출 한계 확립

UR multi-PCR 최소 검출 시간 확립을 위하여, 앞서 확립한 각 프라이머 쌍의 최적 농도와 최적 중합 온도 60 °C를 기반으로 하였으며, 각 PCR 단계의 반응시간을 조절함으로써 병원체 최소 검출 시간을 확립 하고자 하였다. 중합 온도를 제외하고, 변성 90 - 95 °C, 신장 70 - 72 °C 사이에서 조절 하여 40회전 반응하였으나, 변성과 신장의 온도는 기본 조건인 95 °C 이하, 72 °C 이하로 조절하였을 때 증폭에 불리함을 확인하였다. 또한 초기 변성은 15초 미만일 때 PCR 효율이 감소함을 확인하였다 (자료 미제시). 변성과 중합 단계의 반응 시간을 각 1초로 단축하여도 목적 유전자의 증폭에는 큰 변화가 없음이 확인되어, 초기변성 95 °C, 15초, 변성 95 °C, 1초, 중합 60 °C 1초, 신장 72 °C로 PCR 조건을 확립하였다. 최종적으로 신장 시간을 1 - 3초로 하여 꿀벌 애벌레의 핵산 50 ng과 각 재조합 DNA 10⁵ copies를 주형으로 PCR을 수행한 결과, 6종의 병원체 유전자의 증폭은 신장 3초에서 검출에 가장 유리한 형광 값 및 Ct 값의 분포를 보였다 (Fig. 7, A). 또한 각각의 병원체 유전자의 PCR 산물은 특이 Tm값을 나타냈으며 (Fig. 7, B), UR multi-PCR의 형광창과 아가로스 전기영동에서도 특이 산물이 합성됨을 확인하였다 (Fig. 7, C). 이 때 6종 질병 (7종의 유전자)에 대하여 검출이 가능한 UR-multi PCR의 최소 검출시간 (Ramping time 포함)은 12분 57초였다.



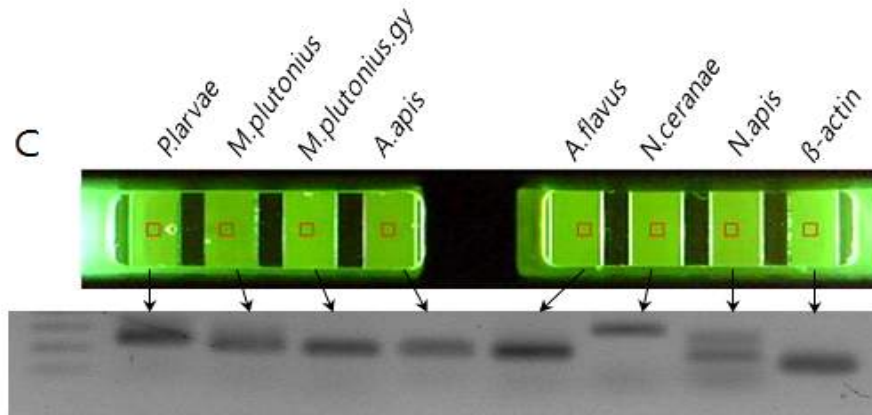


Fig. 7. Minimum running time for detecting 6 honeybee diseases and β -actin gene

In order to confirm the minimum detection time which can amplify seven kinds of gene and β -actin gene, the polymerization time was controlled from 1 sec to 3 sec. Template DNAs were 10^5 copies of recombinant DNA. PCR condition was 95 °C, 15 sec of pre-denaturation, 95 °C, 1 sec of denaturation, 60 °C, 1 sec of annealing, 72 °C of polymerization in each cycle for 40 cycles. The time of polymerization which can amplify all 8 genes was 3 sec. Accordingly, the total running time of UR multi-PCR was 12 min 57 sec. Panel A was the fluorescent graph of amplification and panel B was peak graph of T_m value of each pathogen. Panel C was a fluorescence panel in window (upper) and agarose gel electrophoresis (below) of amplified DNA.

더 나아가 각각의 6종의 질병 (7종의 유전자)에 대한 UR multi-PCR의 최소 검출시간 (Ramping time 포함)은 12분 57초에서 검출 한계는 10^3 copies까지 검출 가능하였다 (Table 5). 또한 더 빠른 시간 내에 병원체 검출 가능성을 타진하기 위해 다른 신장 시간 2초를 적용한 전체 소요 시간 12분 17초 (Ramping time 포함)에서는 10^3 copies의 *N. ceranae* 16S를 제외한 5종 질병 (6종의 유전자)만을, 그리고 신장 시간 1초, 전체 소요 시간 11분 37초 (Ramping time 포함)에서는 *N. ceranae* 16S와 *M. plutoniuns* 16S를 제외한 5종 질병 (5종의 유전자)만을 검출할 수 있었다 (Table 6).

Table 5. Detection limit of UR multi-PCR and Ct and Tm value

Pathogen	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us</i> (gyrase)	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>
Detection limit	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³
Ct	26	34	35	34	24	30	30
Tm	88.26±0.81	87.31±0.41	80.64±0.36	87.78±1.01	89.06±0.66	81.53±0.76	78.62±0.83

Table 6. The minimum running time for UR multi-PCR detection

Total running time (With ramping time)	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us</i> (gyrase)	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>	β-actin
12' 57" (1"1"3")	+	+	+	+	+	+	+	+
12' 17" (1"1"2")	+	+	+	+	+	-	+	+
11' 37" (1"1"1")	+	-	+	+	+	-	+	+

사. 꿀벌 성봉을 이용한 초고속 다중 PCR의 유효성 평가

UR multi-PCR의 유효성을 평가하기 위하여, 질병에 걸린 꿀벌 시료로부터 gDNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 감염된 병원체의 검색을 수행하였다. 꿀벌 질병시료로부터 6종 꿀벌 병원체 중 *Aspergillus flavus*와 *Nosema ceranae*의 존재를 확인할 수 있었으며, 이는 해당 꿀벌 한 마리로부터 회수한 gDNA 50ng을 사용하여 UR multi-PCR을 진행하였다(Fig. 8).

UR multi-PCR 결과에서, *Aspergillus flavus*와 *Nosema ceranae* 특이 유전자 증폭과 함께 비 특이적인 증폭이 관찰되고 있으나, 각 산물의 용점분석에서 특이 병원체 유전자의 증폭과 비특이적 유전자 증폭을 쉽게 구분할 수 있었다. 측정된 *Aspergillus flavus*와 *Nosema ceranae*의 Tm값은 각각 89.21°C, 82.07°C로, 각 병원체의 양성 증폭의 Tm값 범위 (89.57 ± 0.36°C 과 81.80 ± 0.65°C) 안에 해당함으로 해당 병원체의 증폭임을 판정할 수 있었다 (Table 7).

본 실험에서 확인한 두 가지 질병 이외 나머지 4가지 질병에 대해서 형광 그래프 및 용점 분석을 통한 질병 진단이 가능하였으며, 성봉과 같은 천연 시료 사용에 따른 비 특이적 증폭 현상이 관찰되었지만, 모두 전형적 비특이적 증폭에 따른 온도변화, 즉 온도변화의 곡선이 약하게(dF/dT), 다수의 Tm값이 형성되며, 특이 유전자 증폭과는 쉽게 구분될 수 있었다 (Fig.8B).

본 PCR법을 양봉 현장에서 보다 쉽게 사용하기 위하여, 성봉 또는 유충으로부터 보다 간소화된 핵산 추출 방법의 개발이 필요할 것으로 보며, 이런 간편한 핵산 분리법과 본 초고속 PCR법이 연합될 수 있다면, 바로 현장에서 유전자 검사를 빠르게 수행할 수 있을 것이다. 더 나아가 본 연구에서 적용한 DNA기반 병원체뿐만 아니라 꿀벌의 RNA 바이러스에 대하여도 본 연구와 같은 신속한 검출법 개발로 연구가 확장될 것으로 기대하는 바이다.

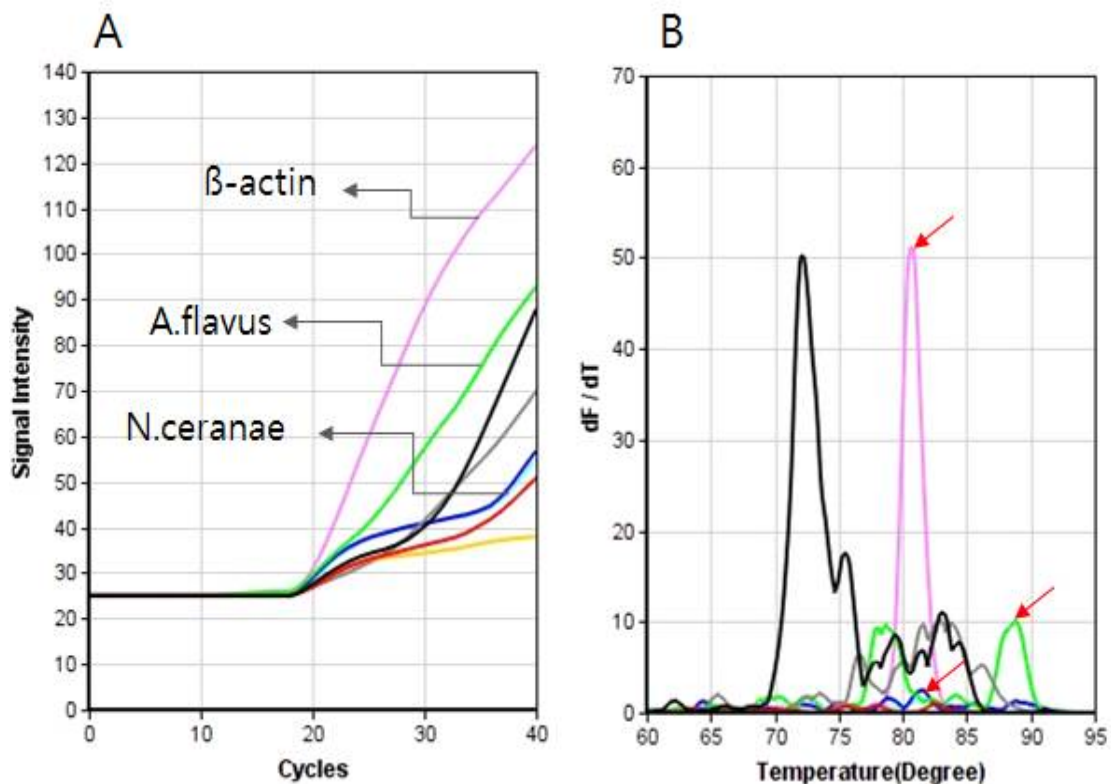


Fig. 8. UR multi-PCR for detecting *Aspergillus flavus* and *Nosema ceranae* from a honeybee sample

UR multi-PCR was performed with 50 ng gDNA from an infected honeybee sample as initial templates. The PCR condition was 95 °C, 15 sec of pre-denaturation, 95 °C, 1 sec of denaturation, 60 °C, 1 sec of annealing, 72 °C, 3 sec of polymerization in each cycle for 40 cycles. *Aspergillus flavus*, *Nosema ceranae* and β -actin gene were amplified. Panel A is the fluorescent graph of amplification with gDNA of infected honeybee sample. Panel B is the peak graph of T_m value.

Table 7. Ct and Tm value of UR multi-PCR detection with honey sample

Pathogen	<i>P.larvae</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us</i>	<i>M.plutoni</i> <i>us(gyrase)</i>	<i>A.apis</i>	<i>A.flavus</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i>	β -actin
Ct	28	33	0	28	23	26	26	21
Tm	72.79	0	0	83.50	89.21	82.07	82.43	81.36
Result	-	-	-	-	+	+	-	+

4. 결론 및 요약

꿀벌 6종 주요 감염성 질병을 동시 진단하기 위한 PCR-chip 기반 초고속 다중 PCR 진단법을 개발하였다. 6종 주요 꿀벌 감염성 병원체들은, 세균성 질병인 미국부저병의 원인균, *Paenibacillus larvae*와 유럽부저병의 원인균인 *Melissococcus plutonius*, 또한 진균인 *Ascospaera apis*(백목병), *Aspergillus flavus*(석고병)와 *Nosema apis*, *Nosema ceranae*(노제마병)를 선별하였다. 개발된 PCR-chip 기반 초고속 다중 PCR은, 꿀벌 주요 병원체 6종에 대하여 각기 10^3 분자이상 존재할 경우 모두 성공적 증폭을 보였으며, 증폭여부의 확인에 걸린 시간(Ct-time)은 6종 중 4종은 9분 내외, 2종은 7분 내외이었으며, 총 40회전의 PCR은 11분 42초, 융점분석 1분 15초로 총 PCR 분석에 소요된 시간은 12분 57초(40회전 및 융점분석)이었다. 표준 DNA 기질을 사용한 PCR-chip 기반 초고속 다중 PCR은 100%에 근접한 정확도를 보였으며, 꿀벌 genomic DNA를 사용한 실험에서 false-amplification은 발견되지 아니하였다. PCR-chip 기반 초고속 다중 PCR은 실험실 내 초고속 진단 뿐 아니라 양봉 현장에서도 신속하고 효율적인 병원체 검출법이 될 것으로 기대한다.

제 7 절 꿀벌의 석고병, 백묵병 현장 진단을 위한 신속 *Ascospaera apis* 및 *Aspergillus flavus* 검출법 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 31(1): 31-39 (2016)에 The Development of Rapid Detection Method against *Ascospaera apis* and *Aspergillus flavus* for On-site Diagnosis of Chalkbrood and Stonebrood in Honey bee의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

백묵병은 *Ascospaera apis*에 의하여 감염되는 진균성 질병으로 *A. apis*는 Maassen에 의하여 1913년 처음 발견되었다. *Ascospaera apis*는 주로 유충에 주로 감염되며, 유충의 몸체를 건조시켜 작은 백묵과 같은 모양으로 죽음을 이르게 한다(Bayley 1967, Flores et al 1996). 또한 노제마, 바이러스, 부저병과 함께 동시감염을 일으킬 수 있는 위험요인이 많은 병원체로 거론되었다(이 등, 2005).

석고병은 *Aspergillus*속의 진균에 의하여 발병된다. 발병을 일으키는 많은 병원체 중 가장 많은 감염을 일으키는 병원체는 *Aspergillus flavus*이며, 이도 주로 유충에게 감염되고 병원성 포자가 유충의 중장관에 유입하여 자라는 등 백묵병과 주요 증상과 감염 경로가 유사하다. 뿐만 아니라 딱딱하게 굳는 사체의 모습도 유사하여 육안으로 병원체의 구별이 어렵다(Bayley, 1967; Puerta *et al.*, 1994; Deans, 1940; De Jong, 1977; Bailey, 1981). 이러한 특징 때문에, 국내외에서 석고병과 백묵병을 혼동하여 사용하였으나, 점차 병원체에 따라 석고병과 백묵병을 구분하여 사용하고 있다(이 등, 2004).

국내의 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)와 동양종 꿀벌(*Apis ceranae*)을 대상으로, 12 가지 꿀벌 질병의 발병 현황 조사는, 백묵병이 조사된 질병체들 중 4.51%를 차지하였으며, 석고병은 37.05%를 차지함을 보여주었다. 이는 국내에는 *Aspergillus flavus*에 의한 석고병이 보다 창궐하고 있음을 보여주는 것으로, 진균성 질병에서도 유행이 있는 것이 아닌가 의문을 들게 한다.

한편 동시감염 결과를 포함하여 석고병은 12 가지의 질병 중 BQCV 다음으로 가장 높은 발병률을 보였고, 여름을 제외한 봄, 가을, 겨울 모두 높은 발병률을 보이고 있음을 보여 주었다(유 등, 2014).

본 연구는 석고병과 백목병의 병원균을 대상으로 새로운 진단법을 개발하고자 하는 것으로, 기존의 실험실적 검사방법과는 달리, 현장진단의 중요성을 인식하여 Ultra-fast PCR system (UF-PCR)을 기반으로 하고자 하였다.

UF-PCR은 SyBr Green과 같은 intercalating 형광 염료가 DNA 사이에 삽입되어야 형광 강도가 증가되는 것을 기본 원리로 하여, 이로써 증폭된 DNA의 양과 형광 강도는 정량적으로 비례하기에, PCR 산물의 증폭 유무를 형광의 강도로 판정하고, 이 판정이 바로 육안으로도 가능하다는 장점이 있다. 또한 일반적으로 사용하는 100 μ l PCR-tube가 아닌 8x 10 μ l PCR-chip을 사용하기에 PCR의 thermocycling에서 보다 빠른 열전도가 가능하며, 보다 신속한 PCR이 가능하며 또한 8개의 다중검사를 동시에 수행할 수 있는 장점도 있다(임, 2013).

*Ascosphaera apis*의 검출법의 경우, real-time PCR 진단법(Lee *et al.* 2006)과 LAMP 진단법(Lee *et al.* 2011) 등이 보고되었으며, 시료의 DNA로 부터 real-time PCR 진단법에 의한 판정은 17 분이 요구되었고, 현장실험을 위한 LAMP 진단법의 경우 1 시간의 검사시간이 요구되었다. real-time PCR과 LAMP진단법은 민감성에서 우수한 유전자 기반의 검출법으로 알려져 왔으나, *Ascosphaera apis*의 real-time PCR 검출법의 경우 10²개 수준의 *Ascosphaera apis* 특이 DNA 분자까지 정량적 검출이 가능하였고, LAMP 진단법의 경우 *Ascosphaera apis* 특이 10³개 수준의 DNA 분자까지 진단 가능하였다.

Aspergillus flavus 검출법은 LAMP 진단법(Lee *et al.*, 2013)과 Real-time PCR 진단법(Bu, 2005) 등이 보고되었으며, LAMP 진단법은 1 시간, real-time PCR 진단법은 약 1시간 30분 정도가 소요되는 것으로 알려져 있다. 기 보고된 백목병 및 석고병의 검출법들은 모두 Real-Time PCR 기반이나 LAMP기반의 진단법들이다. 이들은 모두 실험실에서 사용하기에 충분히 민감한 유전자 검사법이나, 양봉현장에서 사용하기에는 검사에 소요되는 시간, 기기의 이동성 등에서 반드시 적합하다고 하기는 어려우며, 백목병 및 석고병의 병징이 유사한 이유로 양자의 꿀벌 진균성 질병들을 동시에 판별 검출하는 방법은 요긴할 것이다.

따라서, 본 연구는 진균인 *Ascosphaera apis* 와 *Aspergillus flavus* 를 동시에 특이 유전자 검사를 통하여 검출할 수 있으며, 양봉현장에 보다 쉽게 적용시키기 위한 현장진단법으로써 시험 및 판정을 용이하게 하고, 또한 기존 PCR 기반의 검출법보다 빠르고 민감한 검사법을 새로이 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료 수집과 DNA 확보

2015년 12월 제주대 양봉장에서 수집된 석고병 또는 백목병 감염된 유충을 기본 질병 시료로 하였다. 해당 유충을 MagNA lyser (Roche, Korea)로 분쇄한 후, Accu prep Genomic Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 염색체 DNA를 순수분리 하였으며, 이는 분주 후, -70℃에서 보관하며 실험에 사용하였다. PCR실험에서 주형으로 사용한 *Ascospaera apis* 와 *Aspergillus flavus* 의 각 18s ribosomal RNA 유전자들의 재조합 DNA체들은 경기대 유전학 실험실에서 확보하였다(이 등, 2004; 이 등, 2006).

나. *Ascospaera apis*-specific PCR과 *Aspergillus flavus*-specific PCR를 위한 primer의 선발

UF-PCR을 위한 primer들은 설계, 주문 제작하였고(Bionics사, Korea), 이들 primer쌍들은 먼저 Real-Time PCR로 평가하여 선발하였다. Real-Time PCR은 Exicycler™96 (Bioneer, Korea)을 사용하였으며, 주형은 pBX-A.apis, 2.34×10^6 molecules 또는 pBX-A.flavus, 2.83×10^6 molecules를, 각 primer후보는 5 pmole을 각기 사용하였으며, 중합 온도 50~60℃ gradient real-time PCR을 통하여 최고 형광값, Threshold Cycles (Ct value)의 강약을 기준으로 각 primer쌍 후보군들을 평가하여 최종 각 병원체의 검출 프라이머로 선정하였다 (Table 1).

Table 1. Primer sets for detection of fungal pathogens in honeybee.

Pathogens	Name of primer	of DNA sequences (5'→3')	GenBank accession no.	PCR product (bp)	Reference
<i>Ascospaera apis</i>	Asp 312 F	TCT AAA ATG AGA	D63696	312	Lee et al., 2004
	Asp312 R	GTG AAA CCT TCT TGA TCT	(18s rRNA)		
<i>Aspergillus flavus</i>	QPAsco F	ATT TGT TGG C TTA GAG GGA CTA	M83264	230	Lee et al., 2006
	A.apis B3	TCG GTT CT	(18s rRNA)		
		ACA AGC TGA TGA CTT GCG C			

다. *Aspergillus flavus*-specific PCR과 *Ascospaera apis*-specific PCR의 검출 한계

Real-Time PCR로 각 재조합 DNA 주형을 1 ng부터 10 ag (attogram)까지 serial dilution하여 초기 주형량에 따른 검출 한계를 확인하였다. UF PCR 기기는 Genechecker™ (Gensystem, Korea)으로, 이 역시 1 ng부터 10 ag까지 serial dilution하여 같은 실험을 진행하며 비교하였다.

사용한 PCR mix는 SsoFast™ EvaGreen ®Supermix (Biorad, USA)이며, *Aspergillus flavus* 검출에서는 한 반응 당 2.5 pmole의 프라이머를 사용하였고, *Ascospaera apis*는 5 pmole의 프라이머를 각 PCR에 사용하였다. 반응액은 총 10 μ l이었으며, UF PCR은 94°C pre-denaturation 100초 진행 후, 94°C denaturation 10초, 57°C annealing 10초, 72°C extension 10초씩, 총 30 cycle로 수행하였다.

라. 꿀벌 DNA 존재 하에 *Aspergillus flavus*-, *Ascospaera apis*-specific PCR의 검출 한계

재조합 DNA 주형을 1 ng부터 10 ag까지 serial dilution하여, 알려진 어떠한 병원체에도 검출되지 않은 꿀벌의 염색체 DNA 1 ng과 함께 DNA template로 사용하였다. PCR과 결과 분석은 초기 주형량에 따른 검출 한계 실험과 동일하게 진행하였다.

마. *Ascospaera apis* 감염 꿀벌 검체를 사용한 *Ascospaera apis*-specific PCR

Real-Time PCR을 통하여 *Ascospaera apis*에 감염된 것으로 확인된 꿀벌의 염색체 DNA를 순수분리하여, 그 1 ng을 주형으로 *Ascospaera apis*-specific PCR을 수행하였다. 대조군으로 *Nosema ceranae*에 감염된 성충의 염색체 DNA도 사용하였다.

한편, *Aspergillus flavus*-specific PCR은 *Ascospaera apis*에 감염된 꿀벌, *Nosema ceranae*에 감염된 꿀벌을 대상으로 비특이적 PCR 증폭이 없음만을 확인하였다. PCR 조성파 조건은 초기 주형량의 검출 한계 실험과 동일하게 수행하였다.

바. *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR의 최소검출시간

*Aspergillus flavus*의 18s rRNA 유전자를 포함한 재조합 DNA, pBX-A.flavus를 각 PCR당 2.83×10^5 분자를 주형으로 사용하였으며, *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR의 조성은 2x SsoFast™ EvaGreen @Supermix (Biorad, USA), 2.5 pmole specific primers (Table 1), PCR 반응액은 총 10 μ l로 하였다.

Aspergillus flavus-specific UF-PCR과 *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR의 온도 조건은 양자를 동시에 진단하고자 동일하게 조정하였으며, 94°C pre-denaturation 30초 진행 후, 94°C denaturation 5초-1초, 57°C annealing 5초-1초, 72°C extension 5초-1초씩, 총 30 cycle을 수행하였다.

사. *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR의 최소검출시간

Ascosphaera apis-specific UF-PCR의 조성은 2x SsoFast™ EvaGreen @Supermix (Biorad, USA), 5 pmole specific primers (Table 1), 반응 당 총 10 μ l로 하였다. *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR의 온도 조건은 *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR의 그것과 동일하게 조성하였으나, 각 단계(step)의 시간은 검출이 가능한 시간대로 각기 축소하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *Ascosphaera apis*-specific PCR과 *Aspergillus flavus*-specific PCR를 위한 primer의 선발

*Ascosphaera apis*와 *Aspergillus flavus*의 specific UF-PCR을 위하여, 설계 제작된 primer쌍들은 먼저 Real-Time PCR로 평가하여 선발하였다. 평가에서 주형은 *Ascosphaera apis*의 경우, pBX-A.apis를, *Aspergillus flavus*의 경우, pBX-A.flavus를 사용하였다.

Aspergillus flavus UF-PCR에 적용시킬 후보 primer 쌍들은 Asp312 F/R, Asp163 F/R A.flavus-199 F/R, 또는 A.flavus-163 F/R 쌍들이었으며, 모두 annealing 온도 50.0°C-60°C 범위에서 적합한 결과를 보여 주었으나, 최적 annealing 온도를 구하는 실험 중, annealing 온도 50.0°C에서 최종 산물의 생성량, 최저의 Ct (Threshold Cycles) 등을 고려하여 Asp312 F/R 쌍을 *Aspergillus flavus*의 UF-PCR을 위한 primer 쌍으로 최종 선발하였다(Fig. 1).

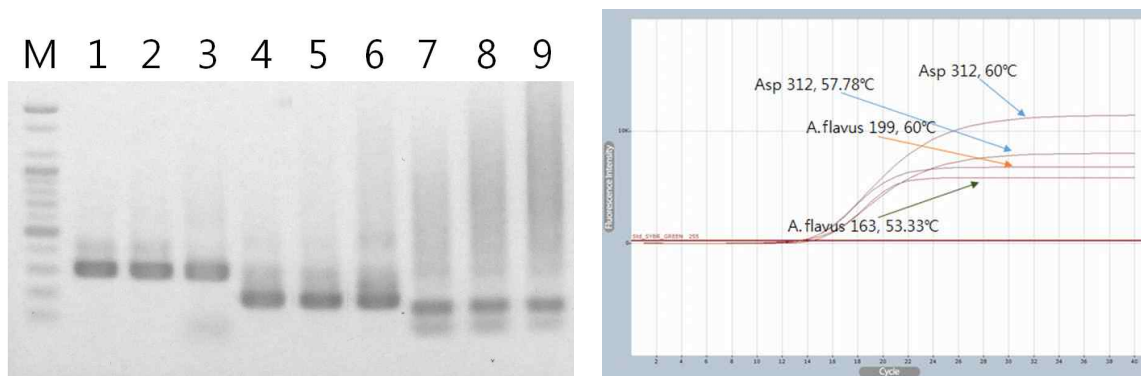


Fig 1. Primer selection for *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR

(Left) Lane M is 100bp ladder marker (bioneer, Korea). Lane 1; PCR was performed with pBX-A.flavus using Asp 312 F/R pairs at 50°C, annealing temperature. Lane 2; same PCR at 55.56°C. Lane 3; same PCR at 60°C. Lane 4; PCR using A.flavus-199 F/R pairs at 50°C. Lane 5; same PCR at 55.56°C. Lane 6; same PCR at 60°C. Lane 7; PCR using A.flavus-163 F/R pairs at 50°C. Lane 8; same PCR at 55.56°C. Lane 9; same PCR at 60°C. (Left). Fluorescence graphs of PCRs using various primer pairs (Right).

*Ascosphaera apis*의 UF-PCR에 적용시킬 primer 쌍들은 QP Asco F/R 또는 QP Asco F/A.apis B3 쌍들이 적합한 결과를 보여 주었으나, 최적 annealing 온도를 구하는 실험 중, annealing 온도 50.0°C에서 최종 산물의 생성량, 최저의 Ct (Threshold Cycles) 등을 고려하여 QP Asco F/ A.apis B3 primer 쌍을 *Ascosphaera apis*의 UF-PCR을 위한 primer 쌍으로 선발하였다(Fig. 2).

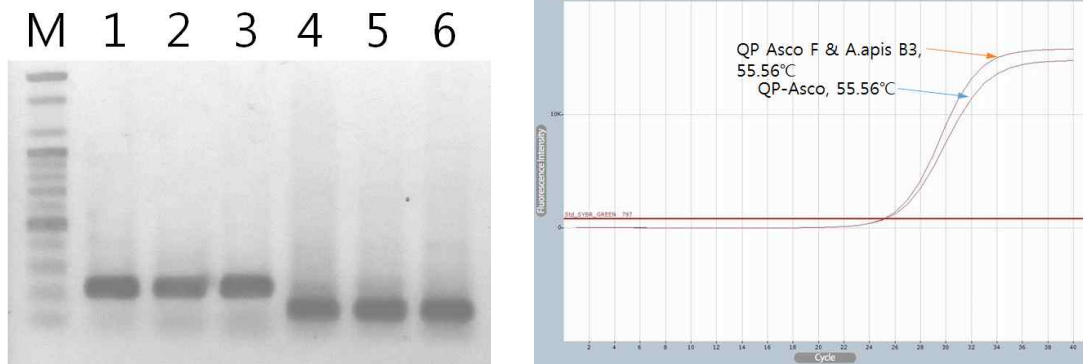


Fig 2. Primer selection for *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR

Lane M is 100bp ladder marker (bioneer, Korea). Lane 1; PCR was performed with pBX-A.apis using QP Asco F/R pairs at 50°C, annealing temperature. Lane 2; same PCR at 55.56°C. Lane 3; same PCR at 60°C. Lane 4; PCR was performed using QP Asco F & A.apis B3 pairs at 50°C. Lane 5; same PCR at 55.56°C. Lane 6; same PCR at 60°C. PCRs using QP Asco F & A.apis B3 pairs were slightly better yields and Ct values than PCRs using QP Asco F/R (on right) in same conditions.

나. *Aspergillus flavus*-specific PCR과 *Ascosphaera apis*-specific PCR의 검출 한계

육안에 의한 형광의 유무 또는 강도로써, 병원체의 존재 유무 및 양을 판단해야 하는 UF-PCR에서, *Aspergillus flavus* 또는 *Ascosphaera apis*의 검출 한계를 알아보고자, 해당 주형 재조합 DNA를 연속 희석하여 각각 특이 UF PCR을 각각 실시하였다.

pBX-A.flavus를 주형으로 사용한 *Aspergillus flavus* 특이 유전자의 검출은, 최소 2.83×10^1 분자(100 ag)까지도, Asp312 F/R primer쌍을 사용한 최적화된 *Aspergillus flavus*-specific PCR에 의해 증폭이 가능함을 보여주었다. 한편 2.83 분자(10 ag)에 대한 상기 PCR에서는 증폭이 확인되지 아니하였으며, 이는 agarose gel 전기영동과 UF-PCR의 형광으로, 쉽게 인지되었다(Fig. 3).

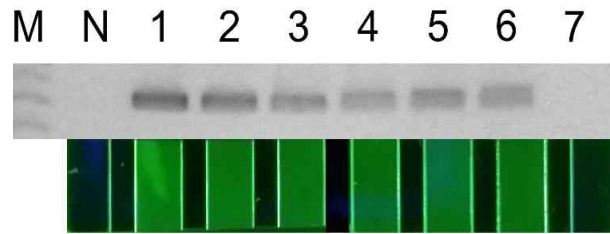


Figure 3. Detection limit of *Aspergillus flavus*-specific PCR.

In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the existences of target gene (pBX-A.flavus) were well recognized by *Aspergillus flavus*-specific UF PCR using Asp312 F/R primer pairs. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane N, negative control without template. Lane 1, *Aspergillus flavus*-UF PCR with 2.83×10^6 molecules of target template . Lane 2, with 2.83×10^5 , Lane 3, with 2.83×10^4 , Lane 4, 2.83×10^3 , Lane 5, 2.83×10^2 , Lane 6, 2.83×10^1 , lane 7, 2.83×10^0 . respectively.

pBX-A.apis를 주형으로 사용한 *Ascospaera apis* 특이 유전자의 검출은, 최소 2.34×10^1 분자(100 ag)까지도, Asco F/A.apis B3 primer쌍을 사용한 최적화된 *Ascospaera apis*-specific PCR에 의해 증폭이 가능함을 보여주었다. 또한, 2.83 분자(10 ag)에 대한 상기 PCR에서 증폭은 확인되지 아니하였으며, 이 역시 전기영동과 UF-PCR의 창에서 육안으로 쉽게 인지되었다(Fig. 4).

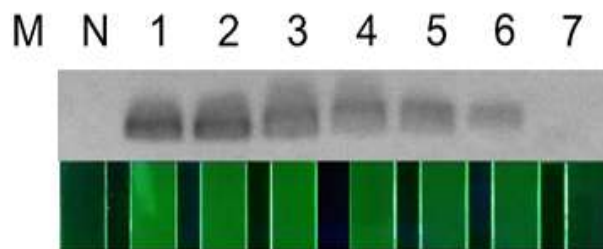


Figure 4. Detection limit of *Ascospaera apis*-specific PCR.

In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the existences of target gene (pBX-A.apis) were well recognized by *Ascospaera apis*-specific UF PCR using QP Asco F/A.apis B3 primer pairs. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane N, negative control without template. Lane 1, *Ascospaera apis*-UF PCR with 2.34×10^6 molecules of target template . Lane 2, with 2.34×10^5 , Lane 3, with 2.34×10^4 , Lane 4, 2.34×10^3 , Lane 5, 2.34×10^2 , Lane 6, 2.34×10^1 , lane 7, 2.34×10^0 . respectively.

다. 꿀벌 DNA 존재 하에 *Aspergillus flavus*-, *Ascospaera apis*-specific PCR의 검출 한계

꿀벌 병원체의 검색을 위하여 사용되는 검체는 주로 유충 또는 성충의 사체이며, 이 이유로 검체는 기본적으로 다량의 꿀벌 유래 유전체를 함유하고 있다. 이 꿀벌 유전체의 존재 하에 *Aspergillus flavus*-specific PCR과 *Ascospaera apis*-specific PCR이 각각 특이적과 민감성을 유지하는지 검사하였다.

Asp312 F/R primer쌍을 사용한 최적화된 *Aspergillus flavus*-specific PCR에, 진균에 감염되지 않은 것으로 확인된 꿀벌의 1 ng chromosomal DNA과 정량화된 pBX-A.flavus를 혼합하여 각기 DNA 주형으로 사용하였다. pBX-A.flavus는 10^6 분자부터 10^0 분자까지 희석하여 각기 사용하였으며, 상기의 조건에서 *Aspergillus flavus*-specific PCR은, 꿀벌 DNA 혼합이 없이 실시한 같은 실험 (Fig. 3)과 같은 수준으로, 최소 2.83×10^1 분자(100 ag)의 specific target를 특이적으로 증폭시켰다. 역시, 최소량인 2.83 분자(10 ag)의 특이 기질에 대한 상기 PCR에서 증폭은 확인되지 아니하였으며, 이는 전기영동과 UF-PCR의 창에서 육안으로 쉽게 인지되었다(Fig. 5).

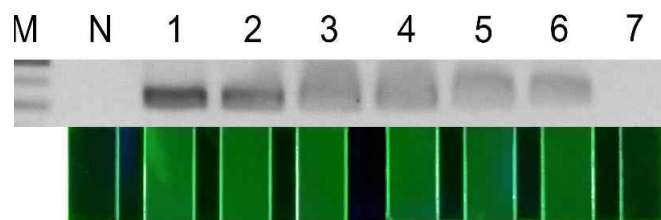


Figure 5. Detection limit of *Aspergillus flavus*-specific PCR with chromosomal DNA from honeybee.

In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the existences of target gene (pBX-A. flavus) were well recognized by *Aspergillus flavus*-specific UF PCR using Asp312 F/R primer pairs with chromosomal DNA from non-infected honeybee. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane N, negative control without template. Lane 1, *Aspergillus flavus*-UF PCR with 2.83×10^6 molecules of pBX-A.flavus and 1 ng chromosomal DNA. Lane 2, with 2.83×10^5 and 1 ng chromosomal DNA, Lane 3, with 2.83×10^4 and 1 ng, Lane 4, 2.83×10^3 and 1 ng, Lane 5, 2.83×10^2 and 1 ng, Lane 6, 2.83×10^1 and 1 ng, lane 7, 2.83×10^0 and 1 ng, respectively.

또한, QP Asco F/A.apis B3 primer쌍을 사용한 최적화된 *Ascospaera apis*-specific PCR의 경우, 꿀벌의 1 ng chromosomal DNA과 정량화된 pBX-A.apis를 혼합하여 각기 DNA 주형으로 사용하였다. pBX-A.apis는 10^6 분자부터 10^0 분자까지 희석하여 각기 사용하였으며, 상기의 조건에서 *Ascospaera apis*-specific PCR은, 꿀벌 DNA 혼합이 없이 실시한 같은 실험 (Fig. 4)과는 달리, 최소 2.83×10^2 분자(1 fg)의 specific target까지만 특이적으로 증폭됨이 확인되었다. 특이 기질 2.83×10^1 분자(100 ag)이하는 agarose gel 전기영동에서도 증폭이 확인되지 아니하였으며, UF-PCR의 창에서는 2.83×10^3 분자(10 fg), 2.83×10^2 분자(1 fg)를 의양성으로 판정하여야 하였다(Fig. 6).

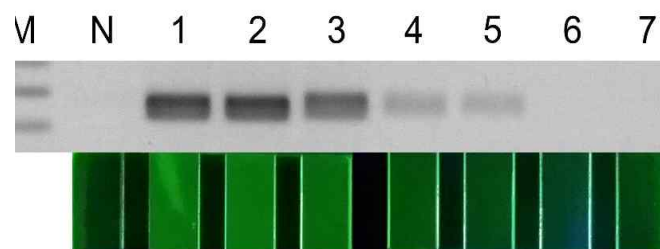


Figure 6. Detection limit of *Ascospaera apis*-specific PCR with chromosomal DNA from honeybee.

In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the existences of target gene (pBX-A.apis) were well recognized by *Ascospaera apis*-specific UF PCR using QP Asco F/A.apis B3 primer pairs with chromosomal DNA from non-infected honeybee. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane N, negative control without template. Lane 1, *Ascospaera apis*-UF PCR with 2.83×10^6 molecules of pBX-A.apis and 1 ng chromosomal DNA. Lane 2, with 2.83×10^5 and 1 ng chromosomal DNA, Lane 3, with 2.83×10^4 and 1 ng, Lane 4, 2.83×10^3 and 1 ng, Lane 5, 2.83×10^2 and 1 ng, Lane 6, 2.83×10^1 and 1 ng, lane 7, 2.83×10^0 and 1 ng, respectively.

선발된 primer쌍을 사용한 최적화된 *Aspergillus flavus*-specific PCR과 *Ascospaera apis*-specific PCR은 30 회전의 UF PCR 조건에서 충분한 target 증폭능력을 보여주었으며, 각기 수십개 분자의 target gene으로부터 특이한 증폭이 가능함을 보여주었다. 한편, 꿀벌의 DNA가 포함된 같은 실험(Fig. 5)에서, *Aspergillus flavus*-specific PCR은 꿀벌의 DNA가 없는 환경에서의 실험(Fig. 3)과 거의 대등한 결과를 보여준 것에 비하여, *Ascospaera apis*-specific PCR은 꿀벌의 DNA가 포함된 같은 실험(Fig. 6)에서, 꿀벌의 DNA가 없는 환경에서의 실험(Fig. 4)에 비하여 100배 수준의 낮은 증폭력을 보여주었다.

이는 제한된 target DNA의 수에 대하여 양자의 UF-PCR은 그 민감도가 다름을 보여주는 것으로, 동량의 target DNA를 동등하게 검출해 내기위하여, 민감도가 열세인 *Ascospaera apis*-specific PCR에서는, 우선 가급적 많은 양의 검체 DNA를 사용하고, 사용하는 각 primer의 양도 5 pmole로 상향 조정하도록 하였다,

또한, UF-PCR에서 형광강도에 의한 판정은, 같은 PCR산물의 전기영동에 의한 판독에 비하여, 극소량의 target DNA를 증폭시켰을 경우, 보다 민감하지 않음이 확인되었다. 이는 UF-PCR의 창에서 형광 유무/강도를 관찰하는 것이 agarose gel 전기영동에서 PCR산물을 검색하는 것에 비하여 10배-100배 불리함을 보여 주는 것으로, 형광강도를 수리적으로 측정, 제시할 수 있는 보완적 방법, 또는 현장판정이후, 실험실에서 해당 PCR산물의 전기영동에 의한 확인 등도 필요한 것으로 판단되었다(Fig. 6).

라. *Ascospaera apis* 감염 꿀벌 검체를 사용한 *Ascospaera apis*-specific PCR

*Ascospaera apis*에 감염된 것으로 확인된 꿀벌에서 *Ascospaera apis*-specific PCR의 유용성을 확인하였다. 최적화된 *Ascospaera apis*-specific PCR은 QP Asco F/A.apis B3 primer 쌍을 사용한 것이며, DNA 주형으로 감염꿀벌에서 chromosomal DNA를 순수분리하여 사용하였고, 대조군으로 재조합 DNA pBX-A.apis 10^6 분자를 사용하였다. 또 다른 대조군으로 재조합 DNA pBX-A.flavus 10^6 분자를, 그리고, *Nosema ceranae*가 감염된 것으로 확인된 꿀벌의 chromosomal DNA를 사용하였다.

결과로써, 최적화된 *Ascospaera apis*-specific PCR은 쉽게 *Ascospaera apis*에 감염된 꿀벌시료에서 *Ascospaera apis*의 존재를 인지하게 하였으며, *Nosema ceranae* 감염 꿀벌과 *Aspergillus flavus*-특이 염기서열(pBX-A.flavus)에 대하여 확실한 음성을 보여주었다(Fig. 7).

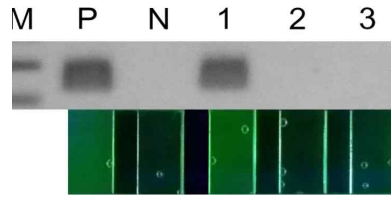


Figure 7. Specific detection of *Ascospaera apis*-specific PCR with *Ascospaera apis*-infected honeybee.

In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the existences of *Ascospaera apis* in honeybee and pBX-A.apis were well recognized by *Ascospaera apis*-specific UF PCR using QP Asco F/A.apis B3 primer pairs. Lane M, 100bp ladder marker (Bioneer). Lane P, *Ascospaera apis*-UF PCR with 2.34×10^6 molecules of pBX-A.apis. Lane N, negative control without template. Lane 1, with 1 ng chromosomal DNA from *Ascospaera apis*-infected honeybee, Lane 2, with 1 ng chromosomal DNA from *Nosema ceranae*-infected honeybee, Lane 3, with 2.83×10^6 molecules of pBX-A.flavus, respectively.

한편, *Aspergillus flavus*-specific PCR의 유용성은 *Nosema ceranae* 감염 꿀벌의 chromosomal DNA와 재조합 DNA pBX-A.apis를 각기 음성 검출대상으로 하여, Asp312 F/R 쌍을 사용한 최적화된 *Aspergillus flavus*-specific PCR을 수행하였다. 결과는 모두 분명한 음성이었으며, 향후 *Aspergillus flavus* 감염 꿀벌의 검출법으로 준비를 완료하였다(자료 미제시).

마. *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR 최소검출시간

*Aspergillus flavus*의 특이 염기서열을 보유한 pBX-A.flavus 2.83×10^5 개 분자를 사용하여 *Aspergillus flavus*-specific PCR 최소 검출시간을 측정하였다. *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR은, pre-denaturation 30 sec 후, 각 회전 중 변성 단계 3초, 중합 단계 3초, 신장 단계 3초로 하였으며, 총 30회전의 UF-PCR을 수행하여, 완료 및 판정까지 총 10분 33초가 소요되었다. 이 실험 결과를 전기영동상과 UF-PCR의 창에서 형광으로 양성임을 확인하였으며(자료 미제시), 나아가 pre-denaturation 30 sec 후, 각 회전 중 변성 단계 2초, 중합 단계 1초, 신장 단계 2초로 하여, 총 30회전의 UF-PCR을 수행하였다. 완료 및 판정까지 소요된 시간은 총 8분 38초의 결과를 agarose gel 전기영동과 UF PCR의 형광에서 모두 양성임을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

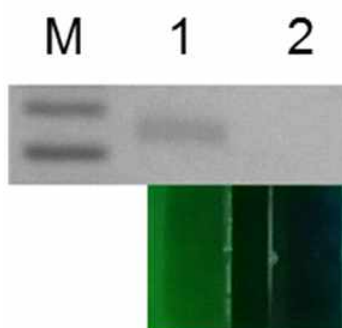


Figure 8. Minimum time of detection using *Aspergillus flavus*-specific UF-PCR .

UF-PCR were performed using Asp312 F/R primer pairs, after 30 sec pre-denaturation, under conditions of 2 sec denaturation step, 1 sec annealing step, 2 sec extension step in each cycles. Total 30 cycles were completed on 8 min 38 sec. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane 1, *Aspergillus flavus*-UF PCR with 2.83×10^5 molecules of pBX-A.flavus. Lane N, negative control without template. In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the amplifications using *Aspergillus flavus*-specific UF PCR were well recognized by naked eyes.

바. *Ascosphaera apis*-specific PCR 최소검출시간

*Ascosphaera apis*의 특이 염기서열을 보유한 pBX-A.apis 2.34×10^5 개 분자를 사용하여 *Ascosphaera apis*-specific PCR 최소 검출시간을 측정하였다. *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR은, pre-denaturation 30 sec 후, 각 회전 중 변성 단계 5초, 중합 단계 5초, 신장 단계 5초로 하였으며, 총 30회전의 UF-PCR을 수행하여, 완료 및 판정까지 총 12분 57초가 소요되었다. 이 실험 결과를 전기영동상과 UF-PCR의 창에서 형광으로 모두 양성임을 확인할 수 있었다(Fig. 9).

나아가 pre-denaturation 30 sec 후, 각 회전 중 변성 단계 3초, 중합 단계 3초, 신장 단계 3초로 하여, 총 30회전의 UF-PCR을 수행하였으며, 완료 및 판정까지 소요된 시간은 총 10분 33초이었다. 이 PCR 결과는 agarose gel 전기영동에서 확인되었으나 UF PCR의 형광창에서는 양성으로 판정할 수 없었다(자료 미제시).

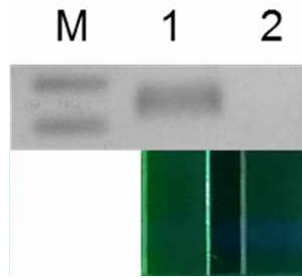


Figure 9. Minimum time of detection using *Ascosphaera apis*-specific UF-PCR.

UF-PCR were performed using QP Asco F/A.apis B3 primer pairs, after 30 sec pre-denaturation, under conditions of 5 sec denaturation step, 5 sec annealing step, 5 sec extension step in each cycles. Total 30 cycles were completed on 12 min 57 sec. Lane M, 100bp ladder marker (bioneer). Lane 1, *Ascosphaera apis*-UF PCR with 2.34×10^5 molecules of pBX-Aapis. Lane N, negative control without template. In agarose gel electrophoresis (upper) and panels in window (low), the amplifications using *Ascosphaera apis*-specific UF PCR were well recognized by naked eyes.

병원체의 검출법 중 최소의 검출 시간은 현장 실험이 가능한가를 판단할 수 있는 중요한 기준이다. 본 연구에서 확인된, 초기 변성 30초를 포함한, 변성 단계 2초, 중합 단계 1초, 신장 단계 2초의 30 cycles PCR은 10^5 개 분자의 target DNA에 대하여 총 8분 38초만에 *Aspergillus flavus* 특이 검출이 가능함을 보여주었다.

한편, *Ascosphaera apis* 검출의 경우, 초기 변성 30초를 포함하여, 5초 변성 단계, 5초 중합 단계, 5초 신장 단계, 총 30 cycles PCR을 총 12초 57분 만에 유효하게 완료하였다. 이 수준의 검사시간이 소요된다면, 이 실험법은 현장 실험법으로 충분히 유용한 것이라 판단되며, 유전자 진단법이기에 어떤 다른 진단법보다 우월한 정확성 및 민감성을 또한 입증할 수 있을 것이다.

현장 진단은, 현장에서 병원체의 확인 시, 즉각적인 대응에 대한 판단이 가능할 것이며, 미동정 검체를 실험실로 우송하는 번거롭고 위험한 과정이 생략되기에, 질병의 전파를 최소화 할 수 있다. 백목병과 석고병에 한정된 본 연구의 결과는, Ultra-fast PCR (UF-PCR)에 기반을 둔 것으로, 이 실험법이 유전자 진단법으로 많은 다른 병원체에 대한 현장 실험법 등으로 응용되기를 또한 기대한다.

4. 결론 및 요약

꿀벌의 진균성 질병인 백묵병과 석고병 진단을 위한 *Ascosphaera apis*와 *Aspergillus flavus*의 신속한 검출법을 새로이 개발하였다. 이는 초고속 PCR (Ultra-fast PCR; UF-PCR)에 기반한 검출법으로써 *A. flavus*와 *A. apis*의 18s ribosomal RNA 유전자를 특이적으로 검출하는 프라이머 세트들을 선정하고 real time PCR과 UF-PCR를 이용하여 개발된 것이다. 결과로써, *Aspergillus flavus*는 8분 38초만에 그 존재여부를 판정할 수 있었고, *Ascosphaera apis*는 12분 57초만에 판정할 수 있었다. 또한, 이 실험법으로 *Aspergillus flavus*의 초기 주형 10^1 DNA까지 존재를 확인할 수 있었으며, *Ascosphaera apis*는 초기 주형 10^3 DNA까지 존재가 확인되었다. 본 실험법은 전기영동의 과정 없이 육안으로 결과를 확인할 수 있다는 장점과 이동이 용이하다는 점에서 병원체 검출을 위한 현장 실험법으로 매우 유용하리라 판단된다. 이러한 실험법의 장점들은 석고병과 백묵병 뿐 아니라 다양한 병원체의 현장 검출법 개발에 널리 적용될 수 있을 것이라 기대된다.

제 8 절 벌집꼬마밀빠진벌레 (*Aethina tumida*)의 신속검출을 위한 초고속 유전자 증폭법의 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 32(2): 119-131 (2017)에 Development of Ultra-Rapid PCR for the fast Detection of Small Hive Beetle (*Aethina tumida*)의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

벌집꼬마밀빠진벌레 (Small Hive beetle; SHB; *Aethina tumida* Murray)는 아프리카에서 처음 발견되었으나, 1998년 미국의 플로리다에 상륙한 이래 (Thomas, 1998), 미국 전역으로 퍼지며 피해를 증가시켜 세계적으로 주목 받게 된 꿀벌의 기생곤충이다. 현재 미국, 호주, 남아프리카 등에서 큰 피해를 입히고 있으며, 2014년 이탈리아에서 그 존재가 발견되어, 유럽의 양봉산업을 위협하고 있다.

벌집꼬마밀빠진벌레가 양봉산업에 미치는 피해는 우선 벌꿀을 산패시키는 효모 *Kodamaea ohmeri*의 숙주라는 점이며, 이 효모는 벌집꼬마밀빠진벌레 유충의 배변을 통하여 벌꿀에 전달되며, 벌꿀을 발효시켜 산패되게 한다 (Benda *et al.*, 2008). 또한 벌집꼬마밀빠진벌레는 꿀벌의 병원성 바이러스인 Deformed Wing Virus (DWV)의 숙주로서 꿀벌의 질병을 야기할 수 있음이 보고된 바 있다(Eyer *et al.*, 2008).

2016년 9월 경상남도 밀양 및 창령에서 국내 최초로 벌집꼬마밀빠진벌레의 서식이 확인되어, 결국 벌집꼬마밀빠진벌레는 국내의 문제가 되었으며, 이들로부터 국내 양봉산업을 보호하기 위한 대책을 시급히 강구하게 되었다 (윤, 2017).

벌집꼬마밀빠진벌레의 적절한 제어는 세계적으로 매우 어려운 난제이며, 성공적인 침입저지의 예도 자연적 소멸인지 방제를 위한 노력의 결과인지 애매한 경우가 많다. 미국의 경우 1998년 플로리다에 상륙한 것을 확인하고, 적절한 대비가 미흡했던 이유로 10여년에 걸쳐 미국전역에 이 기생해충을 널리 퍼지게 하였으며, 현재도 벌집꼬마밀빠진벌레의 성충만을 포집하는 유인 Trap들로 개체수 저감에 노력하는 것이 주요 대책으로 파악된다.

국내의 경우, 2016년 9월 일부 지역의 양봉에서 이들이 발견된 것은, 시기적으로, 아직 국내 벌집꼬마밑빠진벌레의 박멸에 희망이 있다 할 것이다. 이들은 벌집에서만 산란과 유충의 서식이 가능하다는 것은 큰 약점이며, 국내의 관리 양봉의 장점을 살려, 매 봉군을 철저히 검색하고, 구제해 나간다면 꿀벌응애의 국내 전파 이래 또 다른 가장 위험한 꿀벌 기생해충인 벌집꼬마밑빠진벌레를 박멸할 수 있을 것으로 기대한다.

이를 위하여, 각 봉군에 대한 벌집꼬마밑빠진벌레의 존재 유무 판정은 이들의 구제에 가장 필수적인 판단이 될 것이나, 육안관찰 및 포집기의 사용만으로는 알, 초기 유충, 숨어있는 소수의 성충들에 대하여 존재여부의 판정은 매우 부정확할 것으로 생각된다. 이런 단점을 보완하기 위한 방법이 봉변을 이용한 벌집꼬마밑빠진벌레의 특이 유전자 검출이 될 수 있을 것이며, 근래 크게 적용범위를 넓혀나가고 있는 초고속 PCR법은 벌집꼬마밑빠진벌레의 특이 유전자 발견에 크게 도움이 될 것으로 생각되었다.

한편, 미토콘드리아 유전자 CO I (cytochrome oxidase subunit I) 유전자는 진핵생물의 분자계통연구에 사용될 정도로 잘 알려진 유전자이며 (Evans et al. 2000, Evans et al. 2002), 또한 1개 세포는 다수의 미토콘드리아를 가진다는 점, 그리고 이 유전체 (mitochondrial DNA; mtDNA)는 환형이라는 점이, 환경 DNA (eDNA; environmental DNA)의 검출에서 이 유전자가 타 유전자보다 보존성에서 유리한 것으로 사료되며, 벌집꼬마밑빠진벌레 특이 COI 유전자를 검출의 표적으로 사용한다면, 1개 봉군의 봉변이라는 미소환경 (Micro-environment)에서 벌집꼬마밑빠진벌레의 존재를 능히 검출할 수 있을 것이라 판단되었다.

사실, Ward 등 (2007)은 봉변으로부터 벌집꼬마밑빠진벌레 특이 염기서열을 실시간 PCR (Real-Time PCR)로 증폭시켜, 이들의 존재여부를 판정하는 방법을 제시한 바 있었으며, 이 방법의 유용성을 입증하였다. 이들의 방법은 실험실적 검사로써 우수하였으나, 양봉현장에서 시험을 실시하기에는 긴 실험시간이 요구되는 등 그 적용에 한계를 보인 바 있었다.

따라서, 본 연구는 초고속 정량 PCR법을 적용하여 실험실 및 양봉 현장 실험이 모두 가능한 검출법을 추구하고, 환경 DNA의 개념에서 보다 특이성을 높인 새로운 SHB 특이 초고속 정량 PCR법을 개발하여 각 봉군마다 벌집꼬마밑빠진벌레의 존재 여부를 보다 정확히 판정할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 벌집꼬마밀빠진벌레 시료 확보 및 genomic DNA의 순수 분리

벌집꼬마밀빠진벌레(SHB)는 순천대학교 홍기정교수가 직접 채집한 국내 침입 SHB의 유충을 사용하였으며, 확보된 SHB 유충은 90% EtOH에 침전시켜 -20℃에서 냉동보관 하며 실험에 사용하였다.

COI 유전자의 확보를 위하여 SHB의 genomic DNA (gDNA)를 순수분리하였으며, 이는 유충을 막자사발에 넣고 액체질소로 동결시킨 후 분쇄하고, 분쇄액을 DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen Co, Germany)를 사용하여 제작사의 지시에 따라 순수분리과정을 진행하였다. 순수분리된 gDNA는 COI 유전자가 위치한 mtDNA가 포함된 것으로, Biophotometer (Eppendorf Co, Germany)를 사용하여 DNA를 정량한 후 -70℃에서 보관하였다.

꿀벌 (*Apis mellifera*)의 gDNA는 경기대학교 양봉장에서 수집한 유충으로부터 추출하였으며, 이는 본 SHB특이 유전자 증폭에서 대조 기질로 사용하였다. 추출법은 SHB의 방법과 동일하였다.

나. 봉변으로부터 SHB COI 유전자 검출

봉변 (Bee debris)은 경기대학교 양봉장으로부터 서양종 꿀벌의 벌통 바닥에서 수거하였으며, 봉변 2 gram에 SHB 유충 1마리를 넣고 액체 질소를 이용하여 막자사발에서 곱게 분쇄하여 DNA의 순수분리를 시작하였다. 분쇄한 SHB 애벌레 혼합 봉변 시료는 DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen Co, Germany)를 이용하여 gDNA를 순수 분리하고, -70℃에서 보관하였다.

2 gram의 봉변과 SHB 유충 1마리에서 추출된 혼합 gDNA (mtDNA 포함)의 총량은 3.59µg이었으며, 농도는 37ng/µl로 측정 되었다. 본 연구에는 30ng의 혼합 gDNA를 사용하여 COI 유전자의 특이 증폭 반응들을 확인하였다.

다. 특이 primer 제작 및 특이 재조합 plasmid DNA 확보

본 연구에서 사용된 SHB에서 SHB 특이 COI 유전자를 확보하기 위하여 클론화 (molecular cloning)를 수행하였다 (Table. 1).

GenBank의 Database를 기반으로 SHB COI유전자의 공통염기서열을 추론하였으며, 그 크기는 683bp 가 되도록 설계하였다. 설계된 primer들은 각 SHB-CO I F/R로 명명하였으며, 전문회사인 바이오닉스사에 제작을 의뢰하였다 (Table 2).

제작된 SHB-CO I F/R 과 국내 채집된 SHB의 gDNA를 사용한 일반 PCR에서 683 염기 크기의 PCR산물을 얻을 수 있었으며 (자료 미제시), 이는 T-vector cloning을 통하여 클론화를 수행하였고, 얻어진 클론은 pTop-SHB COI 이라 명명하였다. pTop-SHB COI 에 삽입된 염기서열은 전문회사인 (주)인트론에 의뢰하여 확인하였으며, GenBank에 기 보고된 KP134137 (미국산 SHB, 2014)와 가장 염기서열이 유사하였다 (682/683일치; 자료 미제시).

Table1. Recombinat DNA clone for Cytochrome Oxidase subunit I in Small Hive Beetle

Target Insect	Recombinant DNA	Identical Sequence in GenBank	target gene
Small Hive Beetle <i>Aethina tumida</i>	pTOP-SHB CO I *	KP134137	Cytochrome Oxidase subunit I (CO I)
Honey bee <i>Apis mellifera</i>	pTOP-RPS 828**	AADG06003006	Ribosomal Protein S18

* DNA sequences of this clone is identical as reported sequences of KP134137 (236-908), except only 563 position.

** DNA sequences of this clone is 100% identical as reported sequences of AADG06003006(26215-27042).

얻어진 염기서열 정보를 기반으로 초고속 PCR용의 primer 2쌍을 설계하였으며, 이 과정에 서NCBI 사이트의 primer Blast 프로그램을 통해 검출의 특이성을 확인하였고, 그 결과로써 특이적으로 SHB 만 검출이 가능하며, 서양종 꿀벌 (*Apis mellifera*) 및 토종벌 (*Apis cerena*), 그리고 정년기 (2013)가 제시한 벌집 기생해충인 큰꿀벌부채명나방 (*Galleria mellonella* L.), 작은꿀벌부채명나방 (*Achroia grisella* F.), 또한 포식해충인 장수말벌 (*Vespa mandarinia* Smith), 왕잠자리 (*Anax parthenope* Julius), 왕사마귀 (*Tenodera aridifolia* Stoll), 고등털개미 (*Lasius niger*) 등도 검출되지 않을 것임을 유전정보 상으로 확인하였다.

Table 2. Specific primer pairs for SHB-specific CO I gene and Honeybee-specific genes

Target genes	Name of primers	Sequence(5'→3')	Reference
<i>Aethina tumida</i> , Cytochrome Oxidase subunit I (CO I)	SHB-CO I F	TGCGACCCTCAGGCATAACC	This Study
	SHB-CO I R	TGGGAATCATTGAACAAATCCGGC	
	SHB207F	TCTAAATACTACTTTCTTCGACCCATC	Ward <i>et al.</i> 2006
	SHB315R	TCCTGGTAGAATTAAAATATAAACTTCTGG	
	SHB-DP-F1	TGATTCTTCGGACACCCAGA	This Study
	SHB-DP-R1	AGGCTCGAGTATCAACGTCT	
	SHB-DP-F2	CTACTTTCTTCGACCCATC	This Study
SHB-DP-R2	AATGCTCATAGAGTTACTGG		
Honey bee (β-actin)	β-actin151-F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	Yang and Cox-
	β-actin151-R	GACCCACCAATCCATACGGA	Foster 2005
Honey bee (RPS)	RPS18 417 F1	GTCATGGGCACGAATATTGA	This Study
	RPS18 417 R1	TTACTTCTTTTTTCGATACACCCAC	
	RPS18 173 F1	CATGGCTAATCCTAGACAATACAAG	This Study
	RPS18 149 R	CCCAATAATGACGCAAACCT	

라. SHB CO I 유전자의 초고속 검출을 위한 최적 annealing 온도

SHB CO I 특이 초고속 증폭을 위한 최적조건을 구하고자, 각 primer의 최적 annealing 온도를 측정하였다.

이는 55°C±10°C의 범위에서 온도구배 PCR (Temperature-gradient PCR)을 통하여 수행하였으며, 각 반응 당 재조합 DNA 주형인 pTop-SHB COI을 2.09×10⁶ 분자 (약 0.003 femtomole = 약 3 attomole)를 사용하였으며, 각 primer의 최종농도는 0.5μM, 10μl 2xGreenstar qPCR Master Mix (Bioneer, Korea)를 사용하여, 최종 20μl PCR 반응액으로 조성하였다.

PCR 증폭 및 형광값 측정은 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)기 기에서 실시하였으며, 초기변성은 95°C 5min으로 실시하였고, 이후 변성 95°C 30초, annealing 각 55°C ± 10°C에서 각 30초, 신장 72°C 30초를 1회전으로 하여 총 35회전 조건을 수행하였다.

결과는 Ct (Threshold Cycles)값 및 형광 증폭 값의 비교를 통하여 각 primer들의 최적 annealing 온도를 추론하였으며, 이 온도 조건은 Genechecker™(Genesystem, Korea)를 사용한 초고속 PCR에서 검정하였다. 초고속 PCR은 각 반응 당 pTop-SHB COI 2.09×10^6 분자를 사용하였으며, 각 primer의 최종농도는 $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{l}$ $2 \times$ RapiMix (Genesystem, Korea)를 사용하여, 최종 $10 \mu\text{l}$ PCR 반응액으로 조성하였다. 초고속 PCR의 조건은 초기 변성 95°C , 30초 후, 변성 95°C 5초, annealing 각 52°C - 60°C 각 5초, 신장 72°C 5초를 1회전으로 하여 총 40회전을 실시하였다. 이후 온도별 Ct값 및 형광 증폭 그래프 비교를 통해 공통 최적 annealing 온도를 정립하였다.

마. SHB CO I 유전자의 초고속 검출을 위한 최적 primer 최종 농도

SHB CO I 특이 초고속 증폭을 위한 최적조건 중 최적 primer의 농도를 확인하고자, 각 primer의 최종 농도를 $10 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, 500nM 로 조성하여 초고속 PCR을 수행하였다.

각 반응액은 $10 \mu\text{l}$ 로 조성하였으며, 각 반응 당 pTop-SHB COI 2.09×10^6 분자, $2 \times$ RapiMix에 다양한 농도의 각 primer쌍을 넣고 초고속 PCR을 시행하였다. 이때 조건은 초기 변성 95°C , 30초 후, 변성 95°C 5초, annealing 각 52°C - 60°C 각 5초, 신장 72°C 5초를 1회전으로 하여 총 40회전이였다.

바. 검출용 primer 3쌍에 의한 최소 검출 시간 및 검출 한계 측정

SHB 특이 염기서열을 탑재한 pTop-SHB COI을 2.09×10^6 분자부터 2.09×10^0 분자까지 연속 희석하여 초고속 PCR의 주형으로 사용하였으며, $2 \times$ RapiMix를 사용하고, 각 primer에 대해 확립 된 최적 농도의 Forward 및 Reverse primer를 사용하여 총 $10 \mu\text{l}$ PCR 반응액으로 조성하였다.

초고속 PCR 증폭 반응은 초기 변성 95°C , 30초로 고정하고 총 회전수를 50회전에서 진행하였으며, 각 회전의 각 단계, 즉 변성, annealing, 신장의 각 온도를 95°C (고정), 각 primer의 최적 annealing온도 (52°C - 60°C), 72°C (고정)의 온도조건으로, 회전 중 각 단계를 모두 3초, 2초, 1초로 감소시키면서 초고속 PCR에 필요한 최소 증폭시간과 검출한계를 동시에 측정하였다.

사. 꿀벌의 gDNA상에서 검출 primer 쌍의 증폭 확인

꿀벌의 gDNA에서 SHB 특이 각 primer쌍의 유전자 증폭여부를 확인하기 위해 100ng의 꿀벌 gDNA를 사용하였으며, 이 초고속 PCR에서는 SHB 특이 primer 3쌍에 의한 PCR외에, 꿀벌의 고유 유전자인 rDNA와 β -actin1을 증폭시키는 특이 primer를 사용하였다.

각 반응액은 10 μ l로 조성하였으며, 각 반응 당 pTop-SHB COI 2.09×10^6 분자 또는 100ng 꿀벌 gDNA를 주형으로써 사용하였고, 최적 농도의 각 primer쌍, 2 \times RapiMix로 초고속 PCR을 시행하였다. 조건은 초기 변성 95 $^{\circ}$ C, 30초 후, 변성 95 $^{\circ}$ C 2초, annealing 각 52 $^{\circ}$ C - 60 $^{\circ}$ C 각 2초, 신장 72 $^{\circ}$ C 2초를 1회전으로 하여 총 40회전 수행하였다.

아. 꿀벌의 gDNA와 SHB 특이 유전자의 혼합물을 주형으로 한 초고속 PCR

꿀벌 gDNA와 SHB특이 염기서열을 탑재한 pTop-SHB COI를 정량 혼합하여, 초고속 PCR의 기질로 사용하였으며, 이로써 민감도와 정확성을 측정하였다. 반응 당 꿀벌 gDNA는 100ng씩을 고정적으로 사용하였으며, pTop-SHB COI를 2.09×10^6 분자부터 2.09×10^0 분자까지 연속 희석하여 주형으로 사용하였다. PCR 조성은 100ng 꿀벌 애벌레의 gDNA와 2.09×10^6 분자 - 2.09×10^0 분자의 재조합 DNA를 사용하였으며, 2 \times Rapi master Mix, 최적 Primer 농도로 조성하였으며, 조건은 초기 변성 95 $^{\circ}$ C, 30초 후, 변성 95 $^{\circ}$ C 2초, annealing 각 52 $^{\circ}$ C - 60 $^{\circ}$ C 각 2초, 신장 72 $^{\circ}$ C 2초를 1회전으로 하여 총 50회전으로 초고속 PCR을 시행하였다.

자. 봉변-SHB시료부터 SHB COI 특이 유전자의 초고속 정량 검출

2 gram의 봉변과 1마리의 SHB유충으로부터 추출된 혼합 gDNA는 총 3.59 μ g이었으며, 이 중 30ng을 SHB 특이 초고속 정량 PCR의 초기 기질로 사용하였다. 또한 이 total DNA를 단계별로 희석하여 SHB 특이 초고속 PCR에 적용하였으며, 어느 수준의 SHB의 사체가 봉변에 혼합되어 있을 때 이의 존재 입증이 가능한지를 측정, 계산하였다. Ward 등(2007)은 자연적 조건에서 SHB가 발견된 봉군의 봉변에서 PCR검사로써 SHB-특이 유전자의 존재를 밝힌 바 있었으나, 그 양을 다만 Ct값(29.69 cycles)로 제시하였다.

한편, 꿀벌의 gDNA가 봉변에서 어느 수준으로 검출되는지를 확인하고자 꿀벌의 고유 유전자인 RPS 및 β -actin gene을 초고속 정량 PCR로 증폭시켜 양의 측정 및 정량 계산을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

가. SHB CO I 유전자의 초고속 검출을 위한 최적 혼성 온도

SHB 특이 검출용 primer 3쌍에 대한 최적 annealing 온도는 실시간 PCR (Real-Time PCR) 기기인 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer CO., Korea)을 사용한 온도 구배 PCR로 수행하였다.

SHB 특이 검출용 primer SHB-DP F1/R1쌍, SHB-DP F2/R2쌍의 경우, 45°C - 65°C 범위에서 비교적 고른 증폭산물이 관찰되었으며, 최적의 온도 범위는 SHB-DP F1/R1 primer 쌍의 경우 56°C± 4°C에서, SHB-DP F2/R2 primer 쌍의 경우 54°C± 4°C 범위 이었다. SHB 207F/315R primer 쌍의 경우 57°C± 3°C 범위가 최적 annealing온도로 측정되었기에, 3쌍의 primer들은 52°C-60°C의 annealing온도 범위에서 초고속 PCR을 위한 최적 annealing온도를 구하고자 하였다 (자료 미제시).

초고속 PCR은 Genechecker™ (Genesystem, Korea)를 사용하여 수행되었으며, 52°C-60°C의 annealing온도 범위에서 Ct값과 형광의 최고점을 기준으로 평가하였다 (Table 3).

Table 3. Ct and Tm values on each annealing temperatures of three primer pairs

Annealing temperature (°C)	SHB-DP F1/R1		SHB-DP F2/R2		SHB 207F/315R	
	Ct	Final fluorescence	Ct	Final fluorescence	Ct	Final fluorescence
52	-	-	17.61±0.36	189.33±28.22	-	-
54	15.99±0.53	181.33±26.22	16.85±0.47	205.00±37.33	19.46±0.68	172.00±32.67
56	15.17±0.34	187.00±27.33	17.89±0.78	182.67±25.11	19.10±0.99	178.67±26.89
58	16.89±0.18	156.67±17.11	-	-	21.31±1.54	158.00±32.67
60	16.96±0.56	157.67±22.44	-	-	21.29±0.84	147.00±26.00
Tm values(°C)	74.91±0.32		77.02±0.16		76.53±0.32	

SHB-DP F1/R1 primer 쌍의 경우 56°C에서 가장 빠른 Ct값 및 최종 형광값을 보였으며, 54°C에서도 증폭 양상이 비슷하게 나타나는 것으로 확인되었다. 또한 용점 분석을 통해 $74.91 \pm 0.33^\circ\text{C}$ 에서 특이적인 유전자 증폭산물이 나타났다. SHB-DP F2/R2 primer 쌍의 경우 54°C에서 가장 빠른 Ct값 및 최종형광값을 나타내었으며, 용점 분석을 통해 $77.02 \pm 0.16^\circ\text{C}$ 에서 특이적인 증폭산물이 나타났음을 확인하였다. 또한 SHB 207F/315R primer 쌍에서 Ct값이 54, 56°C에서 Ct값이 거의 동일하게 나오나 최종 형광값 비교에서 56°C의 것이 조금 우세한 것으로 판정되었다.

초고속 PCR의 조건에서 3 쌍의 SHB 특이 primer쌍들의 공통 annealing온도는, 각 primer 쌍들의 최적온도들을 감안하여, 54°C로 설정하였다.

나. SHB CO I 유전자의 초고속 검출을 위한 최적 primer 최종 농도

초고속 PCR 방법에 적합한 각 primer 농도를 확립하기 위하여 500nM (5pmole/ μl), 1 μM (10pmole/ μl), 2 μM (20pmole/ μl), 5 μM (50pmole/ μl) 10 μM (100pmole/ μl)의 최종 농도로 조성하여 초고속 PCR을 진행하였다 (Table 4).

Table 4. Ct and Tm values for each concentration of three primer pairs

Final concentration	SHB-DP F1/R1		SHB-DP F2/R2		SHB 207F/315R	
	Ct	Final fluorescence	Ct	Final fluorescence	Ct	Final fluorescence
10 μM	16.37 \pm 0.31	142.67 \pm 6.89	15.87 \pm 0.16	184.00 \pm 6.00	18.77 \pm 0.22	150.67 \pm 3.11
5 μM	14.53 \pm 0.31	169.67 \pm 3.11	14.83 \pm 0.18	220.67 \pm 4.89	17.73 \pm 0.24	170.33 \pm 1.56
2 μM	15.27 \pm 0.16	192.33 \pm 3.78	15.60 \pm 0.40	251.67 \pm 2.89	18.40 \pm 0.27	185.33 \pm 4.89
1 μM	15.10 \pm 0.13	232.67 \pm 15.78	16.20 \pm 0.33	255.00 \pm 2.67	20.20 \pm 0.33	205.00 \pm 4.67
500nM	16.07 \pm 0.22	233.33 \pm 7.56	19.30 \pm 0.20	265.33 \pm 6.44	23.17 \pm 0.31	199.33 \pm 5.11
Tm values($^\circ\text{C}$)	74.91 \pm 0.33		76.69 \pm 0.16		76.86 \pm 0.32	

최적 primer 농도는 각기 3회 반복하여 결과를 얻었으며, 측정 된 각 농도별 Ct값 및 최종 형광 값 그리고 Melting graph에서 비특이적 증폭 양상을 보이지 않는 조건에서 최적 농도를 결정하였다.

이에 SHB-DP F1, R1 primer 쌍은 1 μ M 최종 농도를 사용하였을 때 유리한 Ct값 및 높은 최종 형광값을 나타내어 최적 primer 농도로 설정하였으며, SHB-DP F2, R2 primer 쌍의 경우 2 μ M에서 가장 빠른 Ct값 및 높은 최종 형광값을 나타내었다. SHB 207F, 315R primer 쌍은 2 μ M에서 Ct값 및 최종 형광값 비교를 통해 10 μ M, 5 μ M Primer의 농도에서 Ct값에서는 유리함을 보이나 형광값 확인에서 낮게 측정되며, 1 μ M, 0.5 μ M의 낮은 Primer농도에서는 최종 형광값은 높게 측정이 되나 Ct값이 20cycle 이상으로 불리함을 보기에 2 μ M을 최적 농도로 설정하였다.

다. SHB 특이 검출용 primer 3쌍에 의한 최소 검출 시간 및 검출 한계 측정

3쌍의 primer에 대해 민감도를 확인하고자 앞서 확립된 최적 annealing 온도 및 primer 농도에서 재조합 DNA 주형을 2.09 \times 10⁸ 분자부터 2.09 \times 10⁰ 분자까지 연속 희석하여 검출 한계를 측정하였다.

PCR 조건은 각 회전 당 변성, 혼성, 신장 각 단계를 2초, 2초, 2초의 시간을 주어 실시하였으며, 총 3회 반복을 통해 Ct 및 Tm값의 평균과 표준편차 값을 구하였다. 이때 PCR 반응은 총 50회전이 총 18분 40초 동안 진행되었다 (Figure 1).

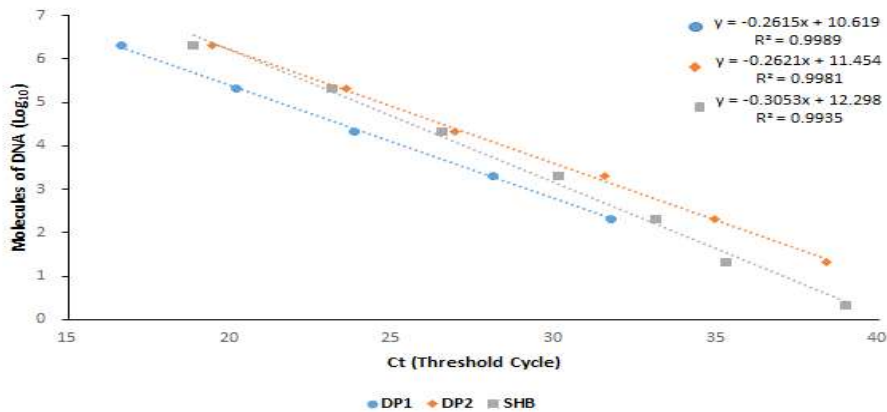


Figure 1. Detection limit and Tm using three primer pairs for SHB CO I specific Ultra-rapid quantitative PCR.

Ultra-rapid PCR with each primer pairs were performed using optimal conditions. pTOP-SHB CO I were used as template in PCR that were diluted from 2.09 \times 10⁶ to 2.09 \times 10⁰ molecules/PCR, respectively. 2.09 \times 10¹ molecules template were amplified successfully by

UR-PCR using SHB DP F2/R2 pairs and SHB 207F/315R pairs, except SHB DP F1/R1 pairs.

SHB-DP F1/R1 primer 쌍을 사용한 초고속 정량 PCR에서, 주형 2.09×10^2 분자 이상이 있을 경우 정확히 정량적 증폭이 됨을 확인하였으며, 이는 형광의 증폭 곡선을 이용한 Ct값 측정, 그리고 Ct값과 주형 분자수를 사용한 회귀식 (Regression equation) $y = -0.2615x + 10.619$ 및 회귀상수 (Regression coefficient; R^2)가 0.9989로 입증할 수 있었다. 사실, 2.09×10^1 분자의 주형에서도 총 3회 반복 실험 중 1회는 검출되는 것으로 나타났다. T_m (Temperature of mid-point)은 $75.88^\circ\text{C} \pm 0.32^\circ\text{C}$ 로 측정되었으며, 2.09×10^0 분자 및 주형을 넣지 않은 대조군에서는 T_m이 각 72.31°C , 72.64°C 로 나타나, 특이적 증폭 산물의 T_m (75.88°C)과 차이를 보였다.

SHB-DP F2/R2 primer 쌍을 사용한 초고속 정량 PCR에서, 주형 2.09×10^1 분자 이상이 있을 경우 정확히 정량적 증폭이 됨을 확인하였으며, 이 역시 회귀식 $y = -0.2621x + 11.454$ 과 회귀상수, $R^2 = 0.9981$ 로 입증할 수 있었다. 이때 T_m은 $77.50^\circ\text{C} \pm 0.32^\circ\text{C}$ 로 측정되었으며, 2.09×10^0 분자 및 주형을 넣지 않은 대조군에서는 T_m이 각 72.31°C , 74.26°C 로 나타나, 특이적 증폭 산물의 T_m (77.50°C)과 차이를 보였다.

SHB 207F/315R primer 쌍을 사용한 초고속 정량 PCR에서, 주형 2.09×10^1 분자 이상이 있을 경우 정확히 정량적 증폭이 됨을 확인하였으며, 이 역시 회귀식 $y = -0.3053x + 12.298$ 과 회귀상수, $R^2 = 0.9935$ 로 입증할 수 있었다. T_m은 $77.18^\circ\text{C} \pm 0.32^\circ\text{C}$ 로 측정되었으며, 주형을 넣지 않은 대조군에서는 T_m이 68.19°C 로 나타나, 특이적 증폭 산물의 T_m (77.18°C)과 차이를 보였다 (Table 5).

Table 5. Ct and Tm using three primer pairs for SHB-specific Ultra-rapid qPCR.

Molecules of recombinant DNA	SHB-DP F1/R1		SHB-DP F2/R2		SHB 207F/315R	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
2.09×10 ⁶	16.62±0.66	76.07±0.17	19.44±0.85	77.67±0.30	18.85±0.80	77.87±0.60
2.09×10 ⁵	20.15±1.47	75.67±0.18	23.58±1.66	77.49±0.01	23.13±0.91	77.60±0.50
2.09×10 ⁴	23.81±1.06	75.85±0.28	26.91±0.81	77.39±0.18	26.51±1.05	77.89±0.34
2.09×10 ³	28.10±0.87	75.67±0.18	31.54±1.72	77.71±0.38	30.10±0.94	77.69±0.17
2.09×10 ²	31.74±1.09	76.05±0.29	34.91±1.24	77.69±0.17	33.09±1.53	77.60±0.50
2.09×10 ¹	34.49±2.22	74.59±1.38	38.37±0.52	77.58±0.35	35.28±1.42	77.60±0.50
2.09×10 ⁰	37.17±1.70	73.29±1.38	40.19±2.14	74.26±0	38.93±0.99	77.60±0.19
Negative	28.06±7.40	72.97±0.46	38.91±1.29	72.31±0	37.74±	68.96±1.08
Average Tm value (Positive)	75.84±0.26		77.59±0.25		77.69±0.38	
Average Tm value (Negative)	73.22±0.78		73.29±1.38		68.96±1.08	
Total Reaction time	18min 40sec /50 cycles					

라. 꿀벌의 total DNA에서 SHB검출용 및 꿀벌DNA검출용 primer 쌍들의 차이

SHB 특이 검출용 3쌍의 primer들과 꿀벌 DNA 특이 primer 쌍들을 사용하여 100ng의 꿀벌 gDNA의 존재 하에 주형으로 초고속 유전자 증폭을 실시하였다.

RPS 유전자는 꿀벌의 gDNA 중의 해당 유전자를 정확하게 증폭시켰으며, RPA-재조합 DNA를 주형으로한 PCR산물과는 약간의 Tm값의 차이를 보였으나, 다량의 꿀벌 gDNA의 존재 여부에 따른 작은 차이로 해석되었다.

SHB 특이 3쌍의 primer쌍을 사용한 초고속 PCR에서 약간의 비특이적 증폭이 관찰되었으나, 이들은 모두 비특이적 증폭의 형광값을 보였으며, 또한 모든 비특이적 산물의 Tm값은 특이 주형을 사용한 초고속 PCR의 산물들과 각기 3℃ 이상의 분명한 차이를 보이고 있어 쉬운 구분이 가능하였다. 꿀벌의 gDNA와 SHB특이 DNA를 혼합하여 주형으로 사용하였을 경우, 모두 쉽게 양자의 차이를 구분해 낼 수 있었다 (Figure 2).

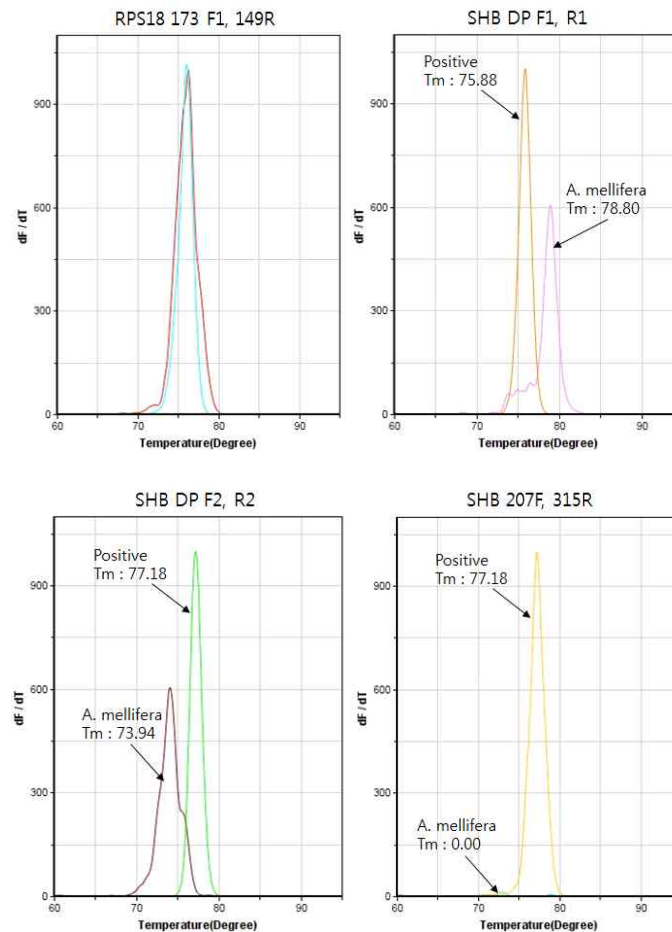


Figure 2. Melting temperature analysis of ultra-rapid PCR with genomic DNA from honeybee and/or SHB-specific DNA using various primer pairs.

RPS genes were successfully amplified by both ultra-rapid PCRs with gDNA from honeybee and/or RPA-specific DNA. All ultra-rapid PCRs using SHB-DP F1/R1, -DP F2/R2, -207F/315R pairs with gDNA from honeybee and/or SHB-specific DNA produced correct or incorrect product, respectively.

마. 꿀벌의 gDNA와 SHB 특이 유전자의 혼합물을 주형으로 한 초고속 PCR

꿀벌의 gDNA와 SHB특이 DNA가 혼합된 상태에서 각 primer 쌍의 SHB특이 검출의 한계를 측정하였다. SHB특이 염기서열을 탑재한 pTop-SHB COI 2.09×10^6 분자에서 2.09×10^0 분자까지 연속 희석한 후, 이들을 각기 100ng 꿀벌 gDNA와 정량 혼합하여 각기 초고속 PCR의 주형으로 사용하였다(Figure 3).

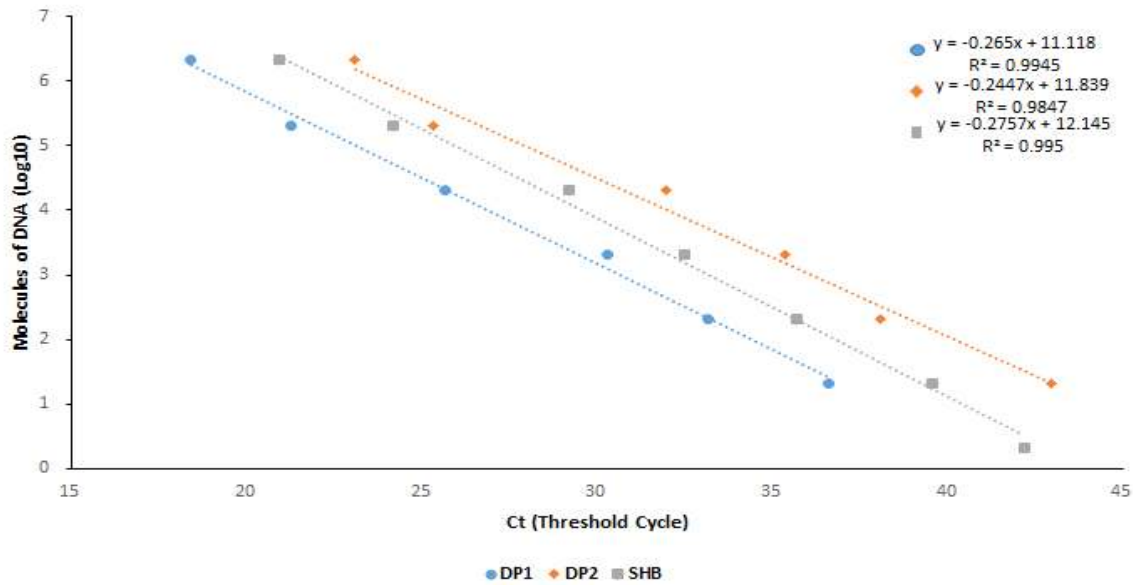


Figure 3. Detection limit of ultra-rapid PCR using three SHB-specific primer pairs with SHB-specific DNA and honeybee gDNA

Ultra-rapid PCR reactions were performed optimal conditions for each primer pairs with 100ng honeybee gDNA. All ultra-rapid PCRs using SHB DP1, SHB DP2, SHB 207F/315R primer pairs could be detected with 2.09×10^1 molecules of SHB-specific DNA under 100 ng honeybee gDNA.

Primer 3쌍을 각기 사용한 초고속 PCR에서, 모두 100ng 꿀벌 gDNA 존재 하에도 2.09×10^1 분자까지 검출 가능함을 보여 주었으며, 특이적 증폭의 T_m 은 SHB DP F1/R1 primer 쌍에 서 $75.82^\circ\text{C} \pm 0.21^\circ\text{C}$ 로 나타나며, SHB DP F2/R2 primer 쌍은 $77.82^\circ\text{C} \pm 0.25^\circ\text{C}$, SHB 207F/315R primer 쌍은 $77.82^\circ\text{C} \pm 0.17^\circ\text{C}$ 로 측정되며, 비 특이 증폭이 일어난 경우 각 primer 쌍에 대해 $79.38^\circ\text{C} \pm 0.59^\circ\text{C}$, $79.53^\circ\text{C} \pm 1.38^\circ\text{C}$, $71.59^\circ\text{C} \pm 0.57^\circ\text{C}$ 으로 측정되어 연속 회색한 모든 SHB주형에서 2.09×10^1 분자까지 특이적 정량 증폭 반응이 일어난 것으로 확인되었다 (Table 6).

Table 6. Ct and Tm values for each number of molecular copies with 3 primer pairs in 100ng Honeybee gDNA

Molecules of recombinant DNA	SHB-DP F1/R1		SHB-DP F2/R2		SHB 207F/315R	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
2.09×10 ⁶	18.38±0.83	76.06±0.12	23.08±1.04	77.88±0.18	20.90±0.76	77.78±0.19
2.09×10 ⁵	21.22±0.72	75.69±0.26	25.31±0.22	77.70±0.33	24.16±0.98	77.60±0.15
2.09×10 ⁴	25.65±0.41	75.76±0.13	31.92±0.45	77.91±0.16	29.17±1.37	77.68±0.28
2.09×10 ³	30.26±1.00	75.76±0.13	35.32±0.67	77.82±0.22	32.45±1.26	77.80±0.03
2.09×10 ²	33.13±1.08	75.88±0.21	38.04±0.46	78.02±0.18	35.65±0.26	77.89±0.09
2.09×10 ¹	36.57±0.77	75.75±0.45	42.92±0.70	77.61±0.36	39.54±0.64	78.02±0.18
2.09×10 ⁰	36.57±0.75	79.57±0.54	44.23±0.76	79.21±1.71	42.16±1.03	78.47±0.00
Negative	27.22±9.15	79.19±0.65	44.24±1.32	79.84±1.04	42.04±1.48	71.59±0.57
Average Tm value (Positive)	75.82±0.21		77.82±0.25		77.82±0.17	
Average Tm value (Negative)	79.38±0.59		79.53±1.38		71.59±0.57	
Total Reaction time	18min 40sec					

바. 봉변-SHB시료부터 SHB CO I 특이 유전자의 초고속 정량 검출

실제 봉변에서 SHB특이 유전자의 검출이 가능한지를 확인하고자, 꿀벌 gDNA 특이 primer 들 2쌍 (RPA, β-actin)과 SHB 특이 primer들 3쌍 (SHB-DP F1/R1, -DP F2/R2, -207F/315R)을 각기 사용하는 초고속 PCR을 시행하였다 (Figure 4).

β-actin 및 RPS 유전자는 봉변으로부터 gDNA의 추출이 정확히 일어났는지 확인하고자 증폭 반응을 실시하였으며, 두 개의 유전자에서 적정 범위의 Tm값을 형성하였으며, 전기영동에서도 동일한 크기의 DNA가 형성된 것을 확인하였으며 (자료 미제시), 이는 봉변으로부터 꿀벌의 gDNA가 추출됨이 확인된 것이다.

SHB 특이 primer들 3쌍을 각기 사용하는 초고속 PCR에서 모두 그리고 각기 SHB 특이 표적유전자인 CO I 의 염기서열이 증폭되었으며, 정확한 SHB유전자가 증폭되었음은 해당 Tm 의 분석으로 그리고 각기 전기영동에 의한 분석으로 확인할 수 있었다.

본 연구와 같이, 2g 봉변에 SHB 유충 한 마리가 존재하는 비율이라면, 여기에서 추출된 total DNA는 3.59μg이었으며, 각 초고속 유전자 증폭에 사용된 30 ng total DNA의 양은 8/1000마리의 SHB유충에서 추출된 SHB의 mtDNA가 포함된 것이며, 초고속 PCR은 이 분자들을 기질로 특이 증폭시켜 보여준 것이다.

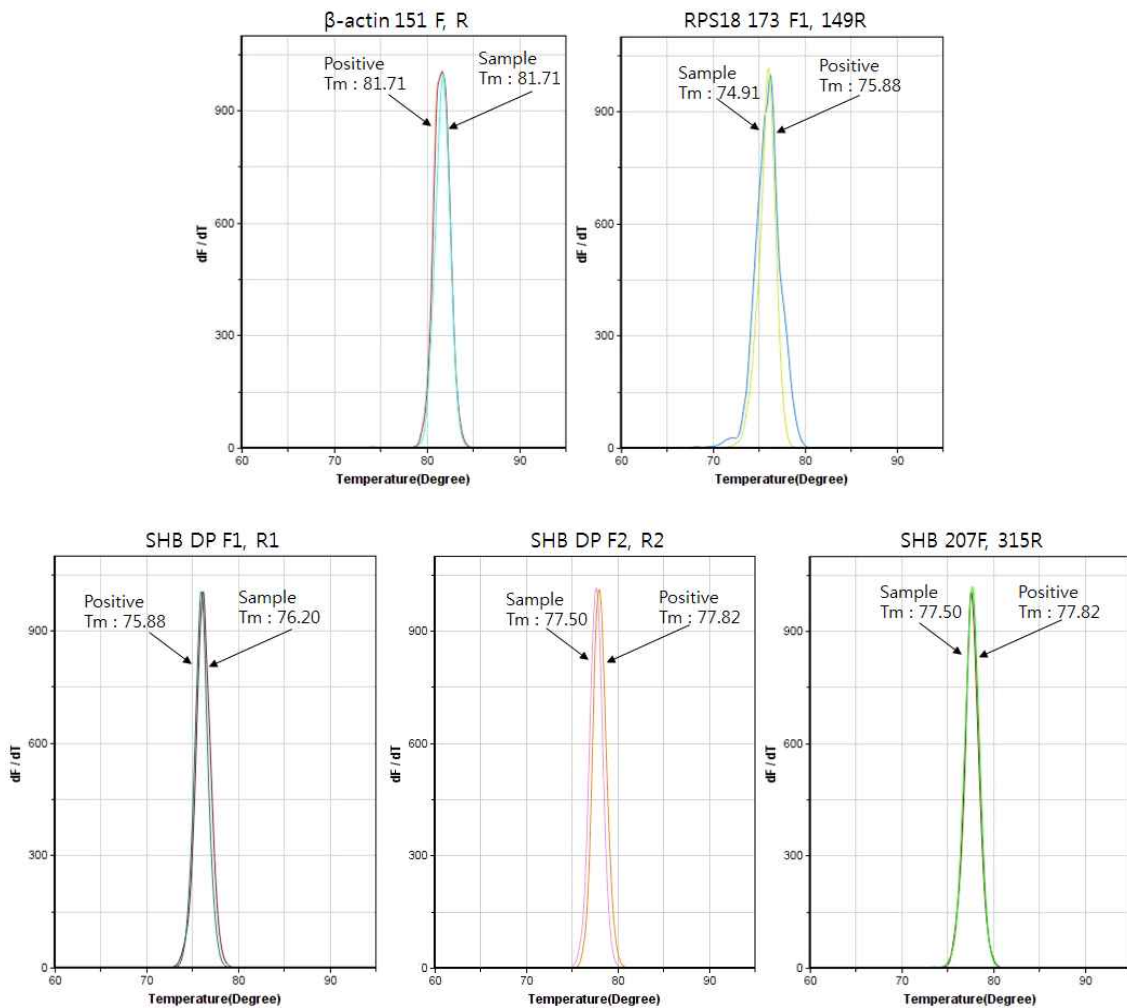


Figure 4. Melting temperature analysis of Ultra-rapid PCRs using 5 different primer pairs with total DNA from bee debris and SHB larvae.

3.59 μ g total DNA was isolated from 2 gram bee debris and 1 SHB larvae. Ultra-rapid PCRs using each primer pairs with 30 ng total DNA were performed. All results demonstrated successful amplification according to primers-specificity.

과연 봉변 중 SHB 사체의 비율이 어느 정도가 될 때까지 SHB 특이 초고속 PCR에 의한 검출이 가능할 지 실험하였다. SHB 혼합 봉변에서 분리한 total DNA를 1/10씩 연속 희석하여 이 희석된 total DNA를 초기 기질로 SHB 특이 초고속 PCR을 시행하였다 (Figure 5).

초기 기질로 total DNA 30 ng, 3 ng, 0.3 ng, 0.03 ng을 사용하였으며, SHB-DP F1/R1, -DP F2/R2 primer 쌍을 각기 사용한 초고속 정량 PCR에서 모두 SHB특이 염기서열이 정량적으로 존재함을 확인하였다.

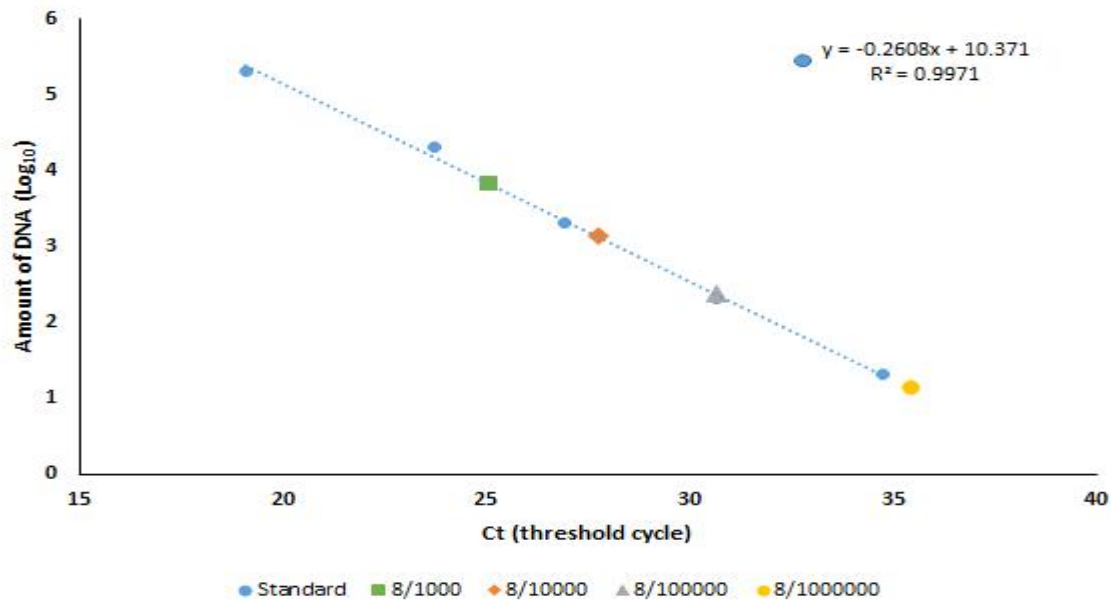


Figure 5. C_{T_s} of Ultra-rapid PCRs using serially diluted total DNA from bee debris and SHB larvae on regression equation using C_{T_s} and SHB-specific DNAs.

Total DNA was isolated from 2 gram of bee debris and 1 SHB larvae. Serially diluted total DNA were measured as 0.008 (6.64×10^3 molecules), 0.0008 (1.37×10^3 molecules), 0.00008 (2.38×10^2 molecules), 0.000008 (1.31×10^1 molecules) SHB larvae, respectively. Standard is indicated PCRs using serially diluted SHB-specific DNA. 8/1000, 8/10000, 8/100000, 8/1000000 are indicated 0.008, 0.0008, 0.00008, 0.000008 SHB larvae, respectively.

초기 기질로 사용된 total DNA 30 ng, 3 ng, 0.3 ng, 0.03 ng은 각기 8/1,000, 8/10,000, 8/100,000, 8/1,000,000 마리의 SHB 유충에서 추출된 DNA가 포함된 것으로, 본 실험의 결과는 10만분의 1 마리의 SHB 유충 사체가 있다면, 그 존재를 특이적, 정량적으로 입증할 수 있다고 계산되었다. 이를 SHB 특이 DNA의 수로 정량화 하면, 0.008마리의 SHB 유충에서 SHB 특이 6.64×10^3 분자가 추출되었다는 것이며, 0.0008마리의 SHB 유충에서 SHB 특이 1.37×10^3 분자가, 0.00008마리의 SHB 유충에서 SHB 특이 분자가 2.38×10^2 분자가, 0.000008마리의 SHB 유충에서 SHB 특이 분자가 1.31×10^1 분자가 각기 추출되었던 것으로 계산되었다.

이는 SHB 유충의 수많은 다리 중 반토막이라도 봉변에 낙하되어 수집된다면, 이는 이미 SHB의 존재를 입증하기에는 충분한 양의 시료라는 뜻이 될 것이다.

본 연구는 근래 국내 침입이 확인된 벌집꼬마밑빠진벌레 (SHB)의 신속하고 정확한 검출을 위하여 추진된 것이다. 육안으로 SHB의 확인이 어려운 SHB의 알, 소수의 SHB 유충, 소수의 SHB 성충이 있는 봉군으로부터 봉변만을 이용하여 SHB 잔존 여부를 확인할 수 있는 방법을 제안하고자 수행하였으며, 봉변이라는 미소환경 (micro-environment)에서 환경 DNA (eDNA; environmental DNA)의 미세분석은 우리에게 중요한 정보를 제공해 줄 수 있음을 보여주었다.

선행연구인 Ward 등 (2007)의 PCR은 전형적 실험실적 PCR 검사로써, 우선 PCR의 조건을, 초기 변성 50°C 2 분 및 95°C 10분 후, 각 회전은 변성 95°C 15초, 혼성 및 중합과정 60°C 1분으로 하여 40회전에 이르게 하였다. 이는 각 작동온도(50°C, 95°C, 및 60°C)로 이동되는 시간(Ramping time)을 제외한, 작동온도에서 주어진 시간만 62분에 이르며, PCR에 사용한 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)의 온도변환 능력을 고려한다면 PCR의 작동시간은 능히 2시간을 초과할 것으로 계산된다.

한편, 본 개발에 사용된 초고속 PCR은, 초기 변성 95°C 30초 후, 변성 95°C 2초, 혼성 56°C 2초, 중합 72°C 2초를 1회전으로 하여 총 50회전으로 Genechecker™ (Genesystem, Korea)를 사용하였다. 이 초고속 PCR에 소요된 총 시간은 18분 40초였으며, 대부분의 시료들은 40회전(15분) 이전에 증폭여부와 Ct값을 측정할 수 있었다(Table 6).

이런 검사시간의 단축은 현장실험의 가능성을 보여주는 것으로, SHB존재여부의 판정을 양봉현장에서도 바로 시행할 수 있을 것이다

초고속 PCR의 또 다른 실용적 장점은 40 cycles 부근의 Ct값이 정확한 정량성을 보인다는 것이다(Table 6). 이는 PCR 중 중합효소(polymerase)가 변성 온도(95°C)에 노출되는 시간의 합이 상대적으로 매우 짧은 것에 기인하는 것으로 판단되며, 40 cycles 이상에서도 PCR의 증폭반등이 실제로 작동됨을 보여준다. 본 연구의 초고속 PCR 조건에서 변성온도에 노출되는 시간의 합은 단 100초(2초 x 50회전)이었으나, Ward 등(2007)의 조건에서는 40회전일 때 이미 10분(600초)에 달하게 되고, 이 이유로 초고속 PCR의 경우, 20개 수준의 표적 분자들도 정량적으로 증폭시킬 수 있음을 보여주었다(Table 6).

작년 9월 국내에 SHB의 침입이 확인된 이래, 이제 SHB는 전국의 봉군으로 서서히 또는 빠르게 전파될 것으로 예상되고 있다. 그러나 국내 양봉이 미국의 경우와는 다르게, 높은 관리 양봉의 수준에 있음을 감안한다면, 우리의 노력으로 이 SHB의 박멸은 어렵지만 가능할 수도 있다는 점을 강조하고자 한다.

본 연구에서 제안된 벌집꼬마밀빠진벌레 특이 초고속 PCR법은 실험실에서 그리고 양봉현장에서 적용이 가능하며, 나름 우수한 검출능력을 보여주고 있다. 지역의 모든 봉군을 대상으로 하는 벌집꼬마밀빠진벌레의 광역 전수 조사나 1개 봉장의 개별 봉군 조사에 모두 유용할 것이며, 본 연구에서 제안하는 봉변으로부터 SHB 유전자의 초고속 검출법이 벌집꼬마밀빠진벌레 검출 및 제어에 널리 사용되길 기대한다.

4. 결론 및 요약

벌집꼬마밀빠진벌레 (Small hive beetle; SHB; *Atheina tumida*)의 신속검출과 대량 조사를 위하여 SHB 특이 초고속 유전자 증폭법을 개발하였다. 3쌍의 *Atheina tumida*-특이 유전자 증폭용 프라이머들은 벌집꼬마밀빠진벌레의 미토콘드리아 유전체 중 cytochrome oxidase subunit I (CO I) 유전자에 근거하여 선발하였다. 최적화된 초고속 PCR은 2.1×10^1 분자의 작은벌집딱정벌레의 CO I 유전자를 18분 40초만에 특이적으로 그리고 정량적으로 검출할 수 있었다. 양봉현장의 적용을 위하여, 봉변으로부터 쉽게 DNA를 추출하는 방법을 고안하였으며, 봉변 1g 중 10^5 분자의 벌집꼬마밀빠진벌레 CO I 유전자가 존재할 경우(1/1000의 SHB 유충 사체), 10분 이내에 벌집꼬마밀빠진벌레의 존재와 분자적 정량을 마칠 수 있었다. 제안하는 이 실험법이 양봉현장에 널리 적용되어, 벌통 내 벌집꼬마밀빠진벌레의 침입여부 판단, 증식의 수준, 그리고 침입지역의 파악 및 제어에 활용되기를 기대한다.

5. 특허출원

본 절의 내용은 대한민국 특허, 출원번호 10-2017-0149858 (접수번호 1-1-2017-1119431-35), 발명의 명칭 “초고속 PCR법을 이용한 벌집꼬마밀빠진벌레의 검출 방법” 으로 2017.11.10. 출원되었음.

제 9 절 역전사 실시간 Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA)에 의한 꿀벌 Black queen cell virus의 신속 검출

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 31(1): 41-50 (2016)에 Rapid detection of Black Queen Cell Virus from Honeybee using Reverse Transcription Real-Time Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA)의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

꿀벌은 바이러스, 박테리아, 진균 등 많은 감염성 병원체에 의하여 공격을 받고 있으며, 그 중 바이러스성 병원체는 많은 피해를 야기하고 있으나, 이들에 대한 지식이 매우 부족하여 적절한 대비책을 세우기 어려운 상황이다. 현재 꿀벌의 바이러스성 병원체는 Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV), Sacbrood Virus (SBV), Kashmir Bee Virus (KBV), Deformed Wing Virus (DWV), Black Queen Cell Virus (BQCV) 등, 총18종이 알려져 있다 (Tentcheva *et al.*, 2004; Berényi *et al.*, 2006).

Black Queen Cell virus (BQCV)는 유럽과 미국에서 꿀벌 붕괴의 원인체로 추론된, 주요 병원체이며(Chen *et al.*, 2007), 분류학상 family *Dicistroviridae*에 속하고, 종전까지 피코르나 바이러스 속으로 분류되었으나, 최근에 새로운 크리파바이러스 속으로 재분류 되었다 (Mayo, 2002). BQCV의 RNA 유전체는 두 개의 ORF로 구성되어 있으며, replicase로 추정되는 5'-근접 ORF와 capsid protein인 3'-근접 ORF로 이루어져 있다 (Leat *et al.*, 2000). BQCV는 한국에서도 꿀벌 전반에 많이 발견되는 바이러스로 확인되었다 (Yoo *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2012).

BQCV에 대한 신속한 검출법의 개발은 이 바이러스의 감염 여부 판단과 이 바이러스의 제어를 위하여 반드시 선행되어야 하는 전략이며, Multiplex reverse transcription-PCR (Grabensteiner *et al.*, 2007), One-step real-time PCR (Kukielka *et al.*, 2008)과 같이 BQCV의 정확하고 신속한 진단을 위한 여러 가지 핵산 기반 방법들이 개발되어 왔다. 이 실시간 PCR 방법은 정량 실시간 PCR (quantitative Real-Time PCR; qRT-PCR)의 발전과 연함되어 BQCV 뿐만 아니라 다른 꿀벌 바이러스를 탐색하는데 가장 민감하고 정확한 실험법으로 인정되어 왔다(Yoo *et al.*, 2008).

그러나, qRT-PCR은 일반적으로 검사시간에 수 시간이 소요되며, 정교한 thermo cycling 기기를 필요로 하기에, 양봉현장에서 요구되는, 즉석 현장실험을 수행하기에는 적합하지 못한 면이 있다. 이런 실험방법 상 단점을 극복하기 위하여 PCR 검사시간을 극단적으로 단축시킨 초고속 PCR (Ultra-Rapid PCR; UR-PCR) 또는 초신속 PCR (Ultra-Fast PCR; UF-PCR)등이 개발되어, 30회전의 PCR을 5분-8분에 완료시키는 진보를 보이고 있다(Yoo *et al.*, 2011; Giang *et al.*, 2015).

Recombinase Polymerase Amplification (RPA)은, PCR과는 달리, 등온에서 특정 유전자의 염기서열을 증폭시키는 실험법이며(Piepenburg *et al.*, 2006), 보다 빠른 유전자 증폭을 기대할 수 있는 실험법으로 개발이 진행되고 있다. RPA는 recombinase, single strand binding protein (SSBP), strand displacing DNA polymerase, 그리고 specific primer 등의 조성으로, 보통 37°C 등온에서 반응이 진행되며, 반응시간은 30분 내외가 추천되고 있다. 근래 이 RPA에 의한 다양한 병원체의 검색법들이 계속 보고되고 있으며, 우수한 유전자 진단법으로 점차 적용범위를 넓혀 나가고 있다. 그러나, 꿀벌 병원성 바이러스의 검출에 대하여 RPA 기술이 접목된 것은 찾아 볼 수 없었으며, 또한 꿀벌 병원체 전반에 대하여도 RPA 기반 실험법이 알려진 것은 없었다.

따라서, 본 연구는 RPA 기술에 기반을 둔 꿀벌 바이러스 BQCV의 검출법을 새로이 개발하고자 하였으며, 이 기술을 꿀벌 바이러스 전체, 나아가 꿀벌 병원체 전체에 대한 검출법으로 적용시킬 수 있는지, 그 기술적 유용성을 평가해 보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 꿀벌 병성 시료

본 연구에서 사용된 모든 꿀벌 시료는 국내산 서양종 꿀벌인 *Apis mellifera*이며, 2015년에 한국의 양봉농가로부터 채집되어 한국꿀벌질병연구소에 위탁된 성충 사체이다. 병성 시료는 공급처에 따라 각각 50 mL conical tube에 담아, 접수 즉시 -70°C에 보관되었다. BQCV-specific PCR 결과에 따라, BQCV 감염이 확인된 시료를 선별하여 본 연구에 사용하였다. 또한 DWV (Deformed Wing Virus)-specific PCR 결과에 따라, DWV 감염이 확인된 꿀벌도 선별하여 사용하였다.

나. 전체 RNA의 순수분리 및 cDNA 제작

수집한 시료 중 두 마리의 성충 꿀벌을 임의로 선택하였으며, MagNA Lyser green Beads (Roche, Switzerland)를 사용하여 꿀벌을 분쇄하였다. 전체 RNA는 Allspin™ (GeneAll, Korea)를 사용하여 추출하였다. 추출된 전체 RNA는 Biophotometer (Eppendorf, Germany)를 사용하여 핵산의 농도를 측정하였으며, 1 µg의 전체 RNA를 주형으로 AccuPower® RT Premix (Bioneer, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하여 -70°C에 보관하였다. 본 연구에서는 합성 직 후의 cDNA를 real-time RPA와 real-time PCR 실험의 주형으로 이용하였다.

다. 재조합 DNA 주형의 준비 및 quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

pGEM-BQCV-VP3는 BQCV의 VP3유전자가 탑재된 플라스미드이다(Giang *et al.*, 2015). 이는 pGEM-3Zf(+) vector (Promega, USA)에 BQCV의 VP3 유전자를 클론화한 것이며, 이는 대장균 DH5a에 보관되었다. 이 재조합 DNA의 clone에서 DNA-spin™ Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 pGEM-BQCV-VP3를 순수 분리하였으며, Biophotometer (Eppendorf, Germany)를 이용해 DNA농도를 측정하고, 추출된 DNA는 -20°C에서 보관하며 사용하였다.

qRT-PCR은 SYBR green의 형광을 이용하였으며 모든 반응은 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)을 사용하여 수행하였다. 총 반응액은 20 µl로 하였고, 조성은 HiPi Real-Time PCR 2x Master Mix, 1x SYBR green (Elpisbio, Korea), 10 pmole의 프라이머, 그리고 주형으로써 pGEM-BQCV-VP3 DNA 또는 cDNA를 사용하였다.

라. 프라이머 설계 및 제작

BQCV의 구조 단백질 중 하나인 VP3 유전자를 증폭하기 위해 한 쌍의 프라이머를 사용하였다. GenBank database (Accession No. KR074231)에 따라 설계된, BQCV-VP3-F1 (forward)와 BQCV-VP3-R1 (reverse)은 각각 KR074231의 염기서열 중 139 bp부터 269 bp의 위치에 결합되는 것으로, 131 bp의 PCR 산물이 제작되도록 디자인 하였으며, 바이오닉스 (Bionics, Korea)사에 의뢰하여 제작하였다 (Table 1).

Table 1. Sequences of specific BQCV-VP3 primers

Oligo name	Sequence (5' → 3')	PCR product (bp)	Reference
BQCV-VP3-F1	CTGGGCGAACATCTACCTTTCC	131	Giang <i>et al.</i> 2015
BQCV-VP3-R1	GCAATGGGTAAGAGAGGCTTCG		

마. Real-time Recombinase Polymerase amplification (qRT-RPA)

RT-RPA는 기본적으로 Twist Amp® Basic kit (TwistDx, UK)를 사용하여 수행하였다. RPA reaction mix는 kit의 내용물인 freeze-dried reaction과 280mM MgAc를 제외하고, 각 반응 당 각 2.4 pmole의 프라이머 (BQCV-VP3-F1/R1), 최종 1x rehydration buffer, 최종 1x SYBR green I이 되도록 하였고, vortex로 가볍게 혼합한 후, 이를 freeze-dried reaction이 있는 tube로 옮기어 pipetting으로 내용물을 혼합하였다(Table 2). 혼합액은 qRT-PCR용 200 ul white tube로 옮겼으며, 각 tube에 주형으로 10^7 molecules에 해당하는 1u의 1 pGEM-BQCV-VP3를 첨가하였다. RPA반응은 280mM의 MgAc를 첨가한 후, 37°C의 등온 조건에서 시작하여, 1분을 1 cycle로 하여, 반응시간 40분이면 40 cycle로 나타나도록 하였다 (Table 3). 실시간 DNA 증폭을 측정하기 위하여 SYBR green I (Elpisbio, Korea))을 첨가한 후 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (Bioneer, Korea)에서 RPA 반응을 수행하였다.

Table 2. Compositon of BQCV-RPA

Composition	Volume(μ l)
Distillted water	7.2
BQCV-VP3-F1 (10pmole/ μ l)	2.4
BQCV-VP3-R1 (10pmole/ μ l)	2.4
Primer free rehydration buffer	29.5
10x SYBR green I	5.0
Total	46.5

Table 3. Quantitative Real time PCR instrument set up for RPA

1	37°C	1min
2	scan	
3	Go to step 1	Repeat 40 cycle
4	Melting 60-94°C	1°C/1sec
5	store	8°C

바. One-step Reverse transcription RT-RPA (RT/RT-RPA)

cDNA의 합성과 RT-RPA 반응을 동시에 진행하고자, 추출된 전체 RNA를 주형으로 Reverse transcription과 RT-RPA가 같이 진행될 수 있도록 one-step 반응액을 조성하였다. 기본적으로 AccuPower® RT Premix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 1 μ g의 전체 RNA, 100 pmoles Oligo dT 를 70°C에서 5분간 pre-denaturation 시켰으며, 반응 후 이 용액을, RPA-kit중 freeze-dried reaction (dried pellet)에 옮기어 pipet으로 잘 혼합하였다. 이 혼합액에 RPA kit 중 280mM의 MgAc를 첨가하고, 37°C의 등온 조건에서 RPA반응을 시작하였다. 이로써 one-step reverse transcription RPA는 cDNA 합성과 DNA의 증폭이 동시에 진행되도록 하였으며, 총 반응시간은 40분으로 형광에 의한 DNA 증폭을 실시간 모니터링 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Real-Time RPA와 Real-Time PCR을 이용한 BQCV 특이 유전자의 검출

Real-Time PCR과 Real-Time RPA의 모든 반응에서 주형은 재조합 DNA인 pGEM-BQCV-VP3를 사용하였으며, 모두 동일한 농도의 DNA를 사용하여 수행되었다. 사용된 프라이머 (Table 1)은 양자 모두 같은 염기서열인 BQCV-VP3-F1과 BQCV-VP3-R1이었다.

최적화된 Real-Time PCR의 조건은, 94°C에서 30초간 Pre-denaturation을 진행한 후, denaturaion 94°C, 15초, Annealing 62°C, 15초 그리고 Extension 72°C, 15초로 Total 35

cycle을 진행하였다. Real-Time RPA는 37°C 등온에서 40 cycle로 진행하였다(Table 3).

Real time RPA와 Real time PCR에서 BQCV-VP3 특이 유전자의 증폭이 형광 강도와 melting 온도 분석에 의해 확인되었으며, agarose gel 전기영동에서 양자 모두 예상되었던 131 bp의 DNA 산물을 생성하였다 (Fig. 1; Fig. 2; Fig. 3).

Real-time RPA에는 3분 26초 (3.44 cycles)에서 DNA 증폭이 확인되었으며, 40분의 전체 반응 시간 내 지속적인 증가양상을 보였다. 반면, template없이 진행된 RPA반응은 40분 전체 반응 시간 내 DNA증폭이 확인되지 않았다. Final Fluorescent value는 40분 (40 cycles) 반응 후 5301의 값을 보였으며, 한편 Negative에서는 167로 나타나 두 값의 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

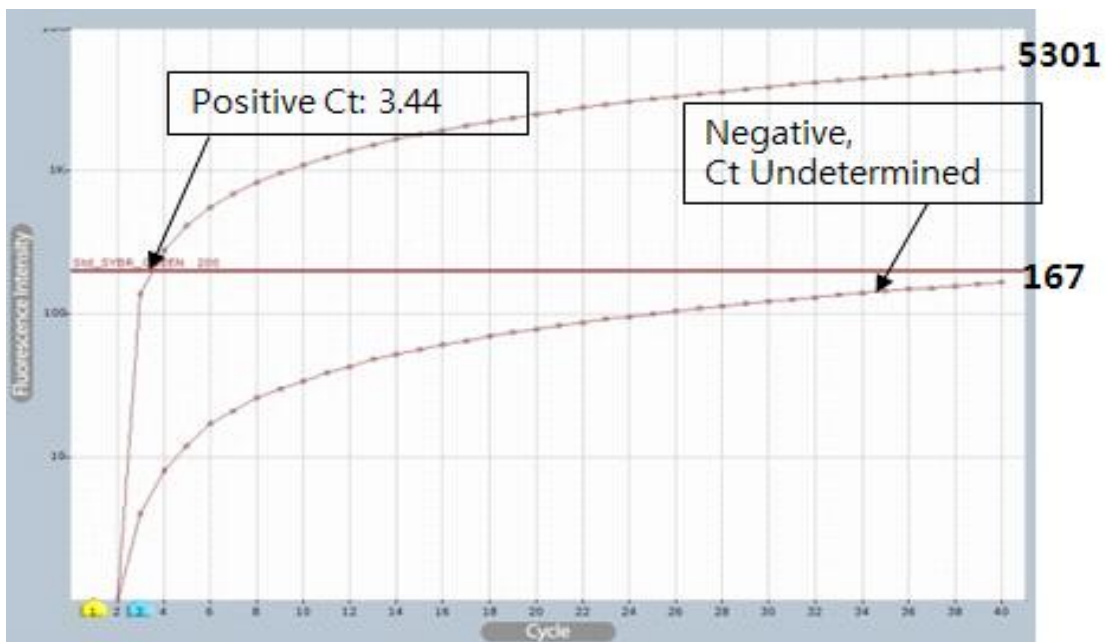


Fig 1. Fluorescence curves of specific DNA amplification using real-time RPA.

Real-time RPAs were performed with 1 ng of pGEM-BQCV-VP3 as template (Positive) or without template (Negative). Fluorescence based on DNA amplification was rapidly increased and passed through the base line on 3.44 cycles, on the time of 3 min 26 sec after beginning of Positive reaction. However, fluorescence from Negative was not reached the base line until 40 cycles (40 min).

반면, Real-time PCR은 16.22 Ct 값 (반응시작 후 41분 42초)부터 DNA 증폭을 확인 할 수 있었으며, 26 cycles (반응시작 후 64분 17초) 지점에서 5514의 최고 형광 값이 측정된 이후 약간의 형광 값 감소가 관찰되어, 최종 35 cycles (반응시작 후 90분)에서 4988의 최종 형광 값이 측정되었다. 반면, template없이 진행된 Real-time PCR은 30.88 Ct 값 (반응시작 후 79분 24초) 이후, DNA의 증폭이 인정되었으며, 최종 35 cycles (반응시작 후 90분)에서 1521의 최종 형광값이 측정되었다 (Fig. 2).

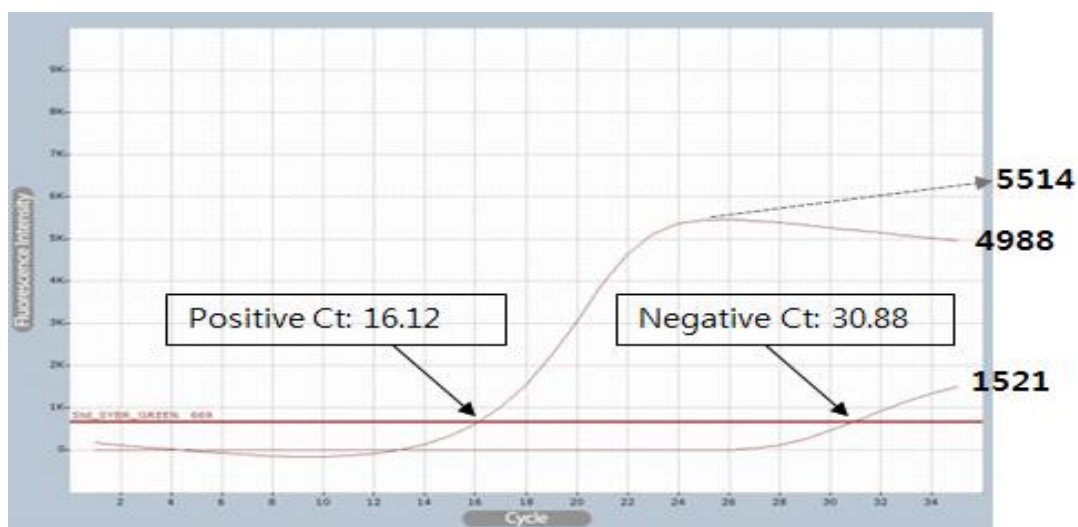


Fig 2. Fluorescence curves of specific DNA amplification using real-time PCR. Real-time PCRs were performed with 1 ng of pGEM-BQCV-VP3 as template (Positive) or without template (Negative). Fluorescence based on DNA amplification was passed through the base line on 16.12 cycles, on the time of 41 min 42 sec after beginning of Positive reaction. However, fluorescence from Negative was passed through the base line on 30.88 cycles, on the time of 79 min 24 sec.

Real time RPA와 Real time PCR의 두 반응은, 종료 이후, 증폭된 DNA를 1.5% Agarose gel 상에서 전개하여 증폭된 DNA의 크기와 양상을 확인하였다. Real-time PCR의 증폭 산물은 예상하였던 131bp의 위치에서 정확하게 확인되었으며(Positive), template없이 같은 PCR을 진행한 negative 반응에서는 DNA 증폭 산물이 형성되지 않았다(Fig. 3A).

RPA에 의한 DNA 증폭 산물은 예상된 131 bp 부위 뿐 아니라 그 상부 쪽에 다양한 끌린 듯한 DNA들이 관찰되었다. 또한, 주형 없이 같은 RPA를 진행한 Negative 반응에서 증폭된 DNA의 양은 크게 감소된 것으로 나타났으나, 같은 형태의 전기영동 상을 보여 주었다(Fig. 3B). 그러나 이 반응 산물들은 프라이머와 unspecific single strand DNA를 제거하는 정제과정 이후 전기 영동상에서 131 bp 크기의 정확한 DNA band를 관찰할 수 있었으며, 주형 없이 진행된 negative 반응에서는 정확한 크기의 DNA 산물을 관찰할 수 없었다. 이 전기영동의 결과로써 RPA에 의해 증폭된 DNA산물은, 생성된unspecific single strand DNA 등과 함께 RPA에서 사용되는 single strand binding protein (SSBP) 등 여러 단백질에 의한 gel mobility shift 현상이 함께 나타난 것으로 추론되었다(Fig 3C).

Real-time RPA와 Real-time PCR의 두 방법은 모두 형광강도를 측정하여, 특히 염기서열의 증폭을 정량적으로 모니터링 할 수 있음을 확인하였으며, Real-time RPA는 Real-time PCR 보다 빠르게 DNA 증폭이 가능함을 인지할 수 있었다. 또한 전기영동을 통해 양자 모두 주어진 프라이머에 따라 정확하게 특정 염기서열만을 증폭시킴을 또한 확인할 수 있었다.

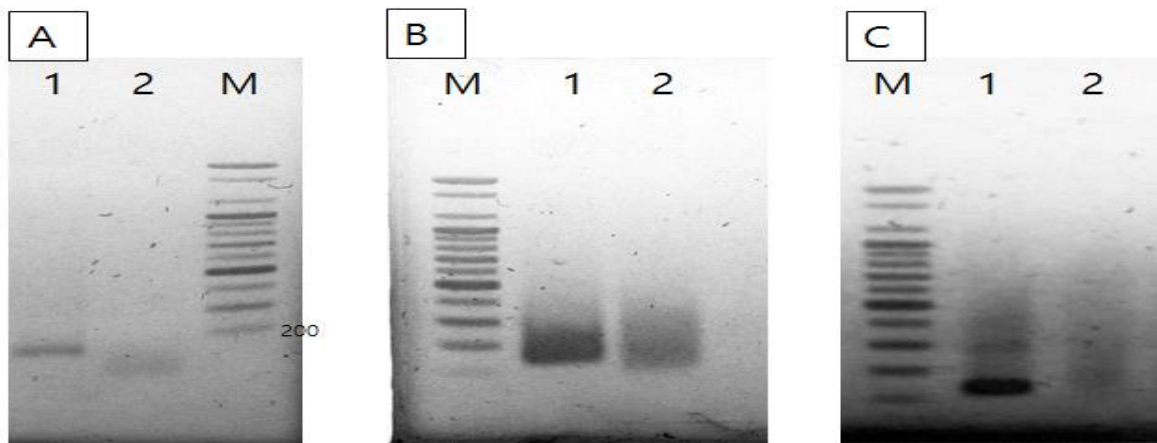


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of amplified DNAs using RPA or PCR.

Panel A. PCR products from real-time PCRs in Fig. 2. Panel B. RPA products before purification from real-time RPAs in Fig. 1. Panel C. RPA products after purification. In each panel, Lane 1 is the amplified product with 1 ng of pGEM-BQCV-VP3 as template, and lane 2 is Negative reaction without template. The expected size of BQCV-DNA was 131 bp long.

나. cDNA로부터 Real-time PCR와 Real-time RPA를 이용한 BQCV의 검출

Real-time PCR과 Real-time RPA 반응에서, 주형으로 cDNA를 사용하였다. BQCV에 감염된 것으로 확인된 꿀벌로부터 전체 RNA를 추출하고, 그 중 1 μ g의 RNA를 사용하여 Reverse transcriptase 반응을 진행하였으며, 이로써 주형으로 사용할 cDNA를 확보하였다. RPA와 PCR 두 반응 모두에서 동일한 양의 cDNA를 주형으로 동일한 프라이머 (Table 1)을 사용하였다.

결과로써, cDNA를 사용한 Real-time RPA 반응에서는 4.31 cycles (반응 시작 후 4분 18초)부터 DNA의 증폭이 인지되었으며, 40분의 전체 반응 시간 내 지속적인 증가 양상을 보였다. 대조군으로 사용한 10^6 분자의 pGEM-BQCV-VP3에 대한 RPA 반응에서는 3.73 cycles (반응 시작 후 3분 43초)에서 DNA의 증폭이 확인되었다. 그러나 negative 반응에서는 앞의 두 RPA 반응의 결과보다 늦은 8.67 cycles (반응 시작 후 8분 40초)부터 DNA 증폭이 인식되었다.

앞의 3개 RPA의 형광그래프는 매우 유사한 형광 값 증가의 모양을 보였으며, 3자의 차이는 Ct value와 최종 형광 값들 이었다. 각 반응의 최종 형광 값들은 각각 4402, 3280, 1145로 측정되었으며, 이는 각 Ct 값인 3.73, 4.31, 8.67 cycles와 매우 유사한 것이었다. 최종 형광값들과 각 Threshold cycles (Ct 값)들을 회귀분석 하였으며, 회귀상수 (Regression coefficient; R^2)는 0.9443인 것으로 계산되었다.

DNA 증폭 반응 종료 이후, 각 증폭 산물을 1.5% agarose gel로 전기영동하였으며, cDNA와 pGEM-BQCV-VP3을 주형으로 사용한 Real-time RPA 반응에서 증폭 산물은 모두 예상 크기인 131bp에서 나타남을 확인하였다 (Fig. 4).

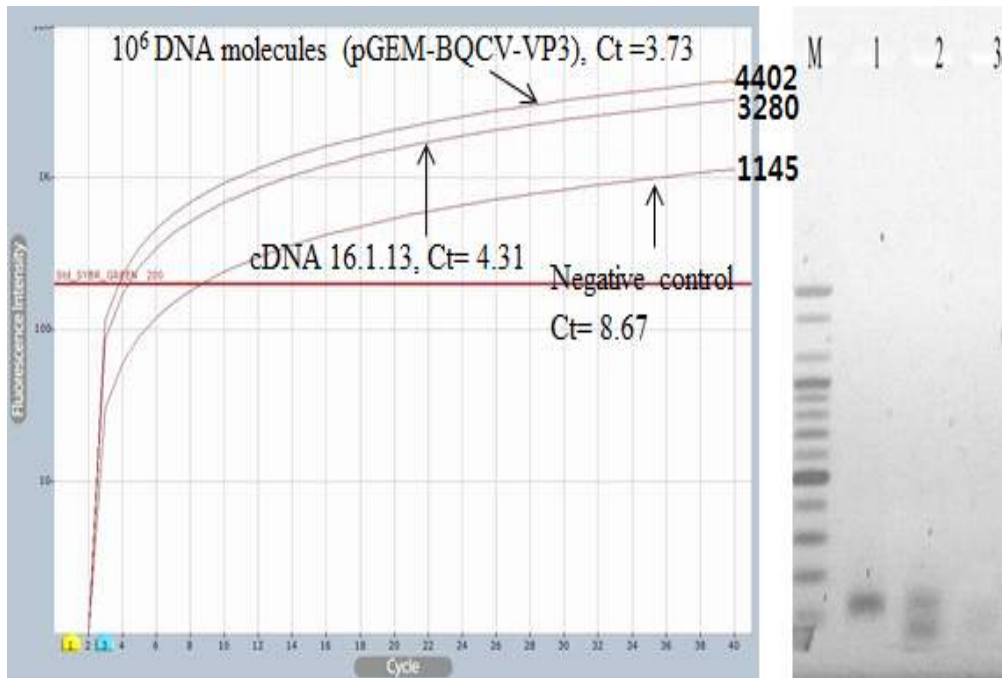


Fig 4. Amplification of BQCV-VP3 sequences from cDNA using real-time RPA.

cDNA from BQCV-infected honeybee was used for the template of Real-time RPA. As positive or negative control, with 10^6 copies of pGEM-BQCV-VP3 or without template, Real-time RPAs were performed, respectively. Ct values and final fluorescence values were estimated for each RPA, 3.73 and 4402 (Positive), 4.31 and 3280 (cDNA), 8.67 and 1145 (Negative), respectively. In right, BQCV-specific 131 bp long products were only observed on lane 1 (Positive) and lane 2 (cDNA).

한편, BQCV에 감염된 꿀벌로부터 제작된 cDNA는, RT-RPA의 경우와 같이, Real-time PCR을 이용하여, BQCV-specific sequence를 증폭시켰으며, Ct 값 24.09 cycles (반응시작 후 66분 5초)에서부터 DNA 증폭을 인지 할 수 있었다. 측정된 형광 값은 40 cycles까지 지속적인 증가세를 보였으며, 최종 형광값은 5173으로 측정되었다. 반면, 주형 없이 수행된 negative 반응은 전혀 DNA 증폭이 확인되지 않았다 (Fig 5).

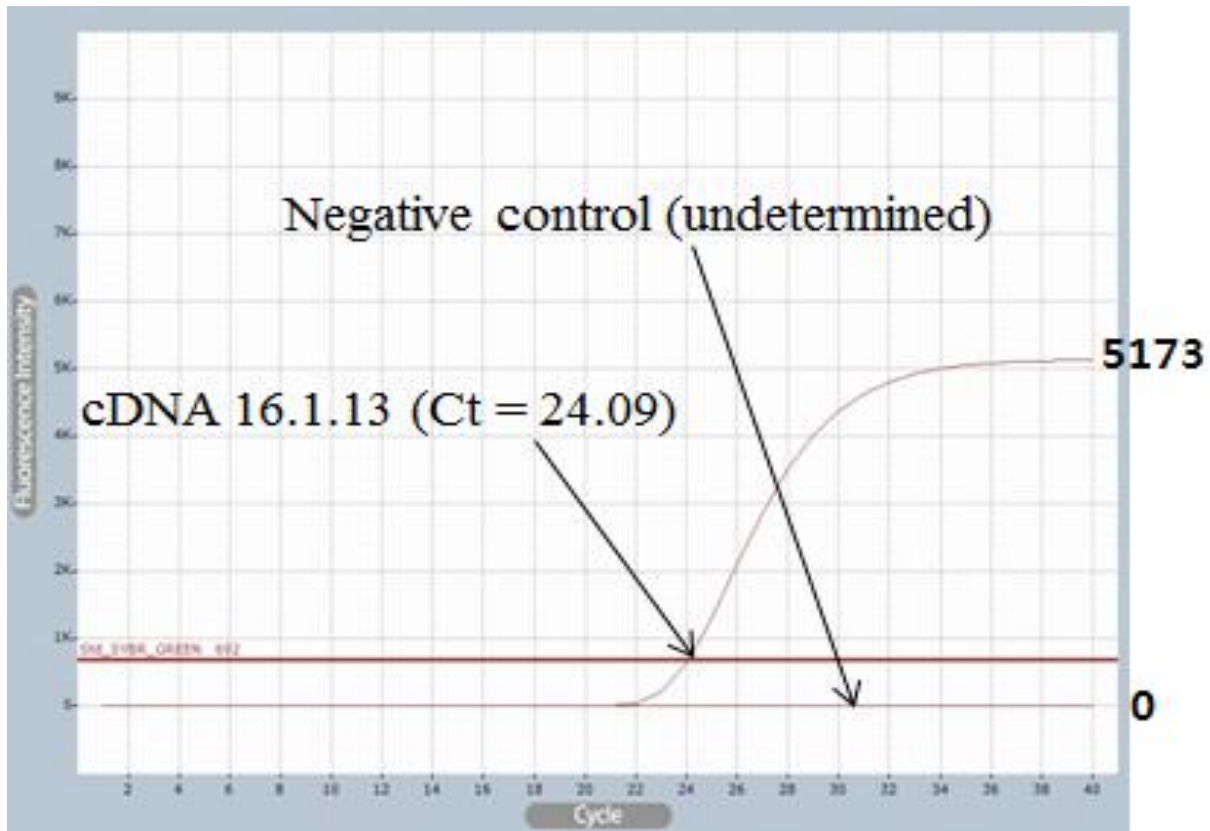


Fig 5. Amplification of BQCV-VP3 sequences from cDNA using real-time PCR.

cDNA from BQCV-infected honeybee was used for the template of Real-time PCR. As negative control, Real-time RPA without template were also performed. 24.09 cycles (Ct values) and 5173 final fluorescence values were estimated, only in RPA with cDNA.

Real-time PCR에 의하여 cDNA로부터 증폭시킨 PCR 산물은 용점분석 (Melting temperature analysis)를 통하여 T_m (temperature of mid-point)을 측정하였다. 측정된 T_m 값은 80.5°C 이었으며, 이는 재조합 DNA pGEM-BQCV-VP3를 주형으로 BQCV-VP3-F1/R1 프라이머를 이용한 PCR 산물에서 얻은 T_m 값과 일치하는 것으로, cDNA로부터 동일한 특이 염기서열을 증폭시켰음을 보여주었다(Fig. 6).

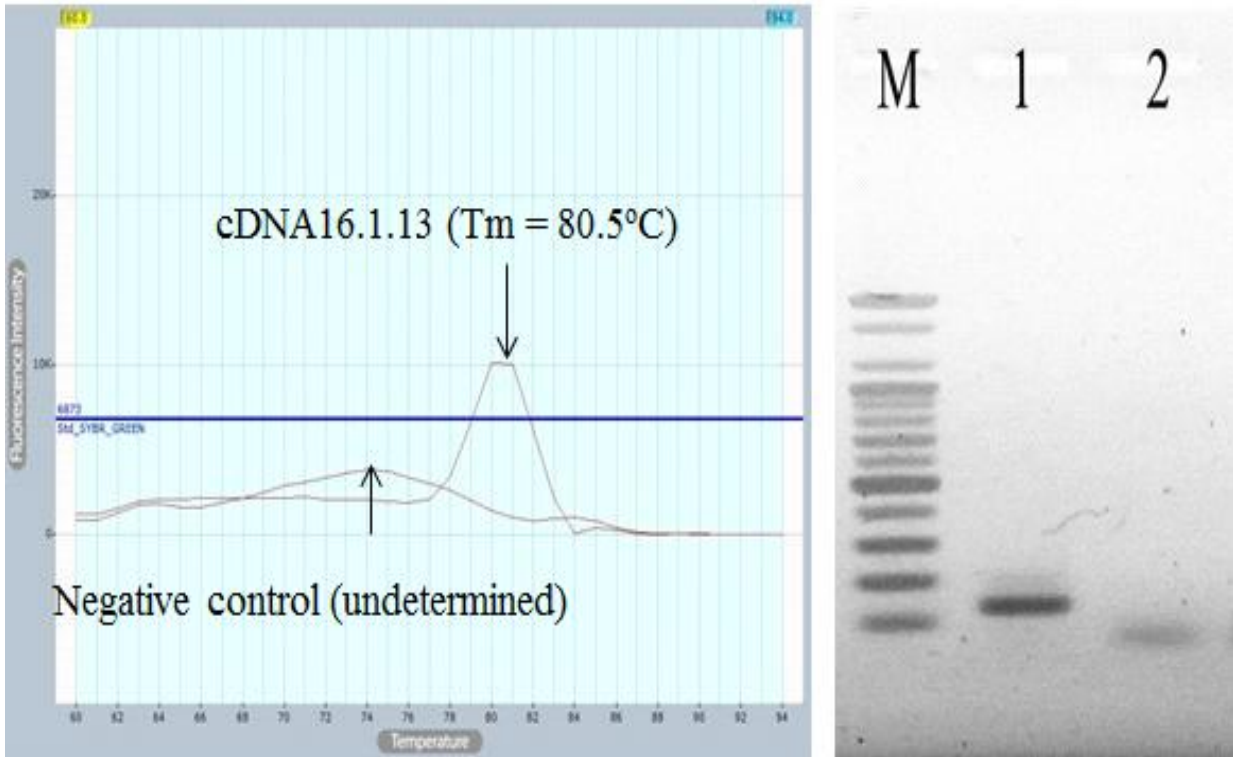


Fig 6. Melting temperature analysis and gel electrophoresis after real-time PCR.

(Left) The temperature of mid-point (T_m) was measured at 80.5°C in only PCR with cDNA, as same as expected. (Right) In agarose gel electrophoresis, expected 131bp long DNA was only observed in PCR with cDNA (lane 1).

BQCV에 감염된 꿀벌로부터 제작된 cDNA를 주형으로, 각각 Real-time RPA와 Real-time PCR을 수행하였을 때 목표로 한 BQCV의 131 bp의 VP3 gene이 정확히 증폭됨을 확인하였다. 양자 간의 반응 시간을 비교하면, 특히 염기서열의 증폭 시점은 Real-time RPA의 경우 반응 시작 후 4분 18초부터 목표로 특이 염기서열이 증폭됨을 인지할 수 있었으나, Real-time PCR의 경우, 반응 시작 후 66분 5초부터 이를 인지할 수 있었다. 양자간의 차이는 61분 47초에 이르며, 이 차이는 보다 빠른 특이 유전자 검출을 위하여, RPA 방법의 활용이 유망함을 시사해 준다.

다. 특정 유전자 검출에 대한 Real-time RPA와 Real-time PCR의 특이성 비교

Real-time RPA와 Real-time PCR 양자 간에, 꿀벌에서 특정 바이러스를 검출해 내는 특이성(specificity)에 차이가 있는지를 비교하였다. 이를 위하여 BQCV에 감염된 꿀벌과 DWV (Deformed Wing Virus)에 감염된 꿀벌로부터 각각 전체 RNA를 순수 분리하였으며, 각각 cDNA를 제작하여 각각 두 가지 분석방법의 주형으로 사용하였다. 정확한 비교를 위하여 주형으로 사용한 BQCV cDNA와 DWV cDNA는 각각 동량을 사용하였으며, 사용한 프라이머는 BQCV의 VP3유전자에 특이적인 BQCV-VP3-F1/R1이었다 (Table 1).

Real-time RPA에서 BQCV cDNA를 주형으로 한 반응에서 5분 53초(5.89 cycles)부터 DNA 증폭이 확인되었으며, DWV cDNA를 주형으로 한 반응에서 반응시작 후 10분 15초(10.25 cycles) 부터 DNA 증폭이 확인되었다. 한편, 주형 없이 수행한 같은 RPA 반응에서는 16분 51초(16.85 cycles)부터 DNA의 증폭이 인지되었다(Fig 7).

RT-RPA의 40분 반응 후, 3개의 반응에 대한 최종 형광값은 각각 1968, 936, 519로 나타났으며, 이는 각 반응의 Ct value인 5.89, 10.25, 16.85 cycle와 함께 초기 주형(initial template)의 정량을 추구하기 위한 주요 척도가 될 수 있을 것으로 사료되었다.

Real-time RPA 반응 종료 이후, 각 증폭산물을 1.5% agarose gel에서 확인한 결과, BQCV cDNA를 주형으로한 반응에서만 131 bp의 BQCV 특이적인 DNA 밴드가 확인되었으며, DWV cDNA와 주형 없이 진행된 반응에서는 131 bp의 BQCV 특이 DNA가 발견되지 아니하였다. 이는 후자의 반응에서 비특이적 DNA를 상대적으로 약하나마 증폭시켰고, 이들의 형광이 감지된 것으로 해석하였다. 이는 또한, DNA 증폭을 형광의 강도로 모니터링하는 형광상과 전기영동상은 정확히 일치하지 않음을 보여주는 것으로 향후 real-time RPA에 의한 특이적 DNA 증폭과 비특이적 DNA 증폭을 형광상에서 구분할 수 있는 척도 (예; Ct 값의 적정성, 최종 형광값의 적정성, 비교용 RPA 등)의 개발이 긴요함을 보여준다 할 것이다.

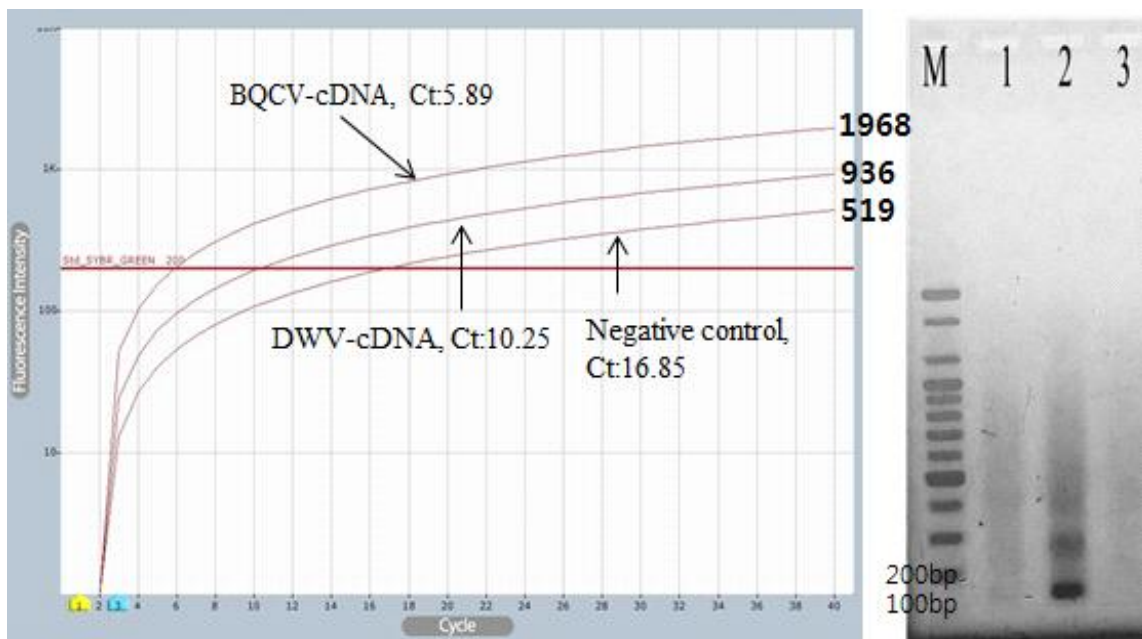


Fig 7. Specificity of Real-time RPAs with cDNAs generated from BQCV- or DWV-infected honeybee.

With BQCV-cDNA using BQCV-specific real-time RPA, BQCV-specific DNA amplification was recognized at 5 min 53 sec (5.89 cycles). With DWV-cDNA using BQCV-specific real-time RPA, un-specific DNA amplification was recognized at 10 min 15 sec (10.25 cycles). Without templates using BQCV-specific real-time RPA, un-specific DNA amplification was also recognized at 16 min 51 sec (16.85 cycles). (Right), BQCV-specific DNA, 131 bp long, was well observed by agarose electrophoresis (lane 2). Un-specific DNAs were also recognized by RPAs with DWV-cDNA (lane 1), or without templates (lane 3), respectively.

한편, BQCV-cDNA를 주형으로한 BQCV 특이 Real-time PCR은, PCR 시작 43분 51초인 Ct 값 17.85부터 표적 DNA의 증폭을 확인 할 수 있었다. 이 PCR은 Ct 값 30 회전부터 형광값의 증가는 극히 미약하였으나, 35회전의 최종 형광값은 5492로 측정되었다. 또한, DWV-cDNA를 주형으로한 BQCV 특이 Real-time PCR은 반응 시작 74분 22초에 Ct 값 29.37부터 DNA의 증폭을 인지할 수 있었으며, 최종 형광 값은 1324로 측정되었다. 비교를 위하여, 주형 없이 수행한 같은 BQCV 특이 Real-time PCR는, 반응 시작 69분 12초에 Ct 값 27.21부터 DNA의 증폭을 인지할 수 있었고, 최종 형광값은 2009로 측정되었다 (Fig. 8).

상기 3개 PCR산물의 특이성 (specificity)를 알아보고자, DNA 용점분석 (Melting temperature analysis)을 실시하였다. 결과는, BQCV-cDNA를 주형으로한 BQCV 특이 Real-time PCR에서만 BQCV 특이 PCR 산물 ($T_m = 80.5$)이 형성되었음을 알게 되었으며, DWV-cDNA를 주형으로 하거나 주형 없이 수행한 BQCV 특이 Real-time PCR은 비특이적인 DNA가 약하게 증폭된다고 판단되었다(Fig. 8).

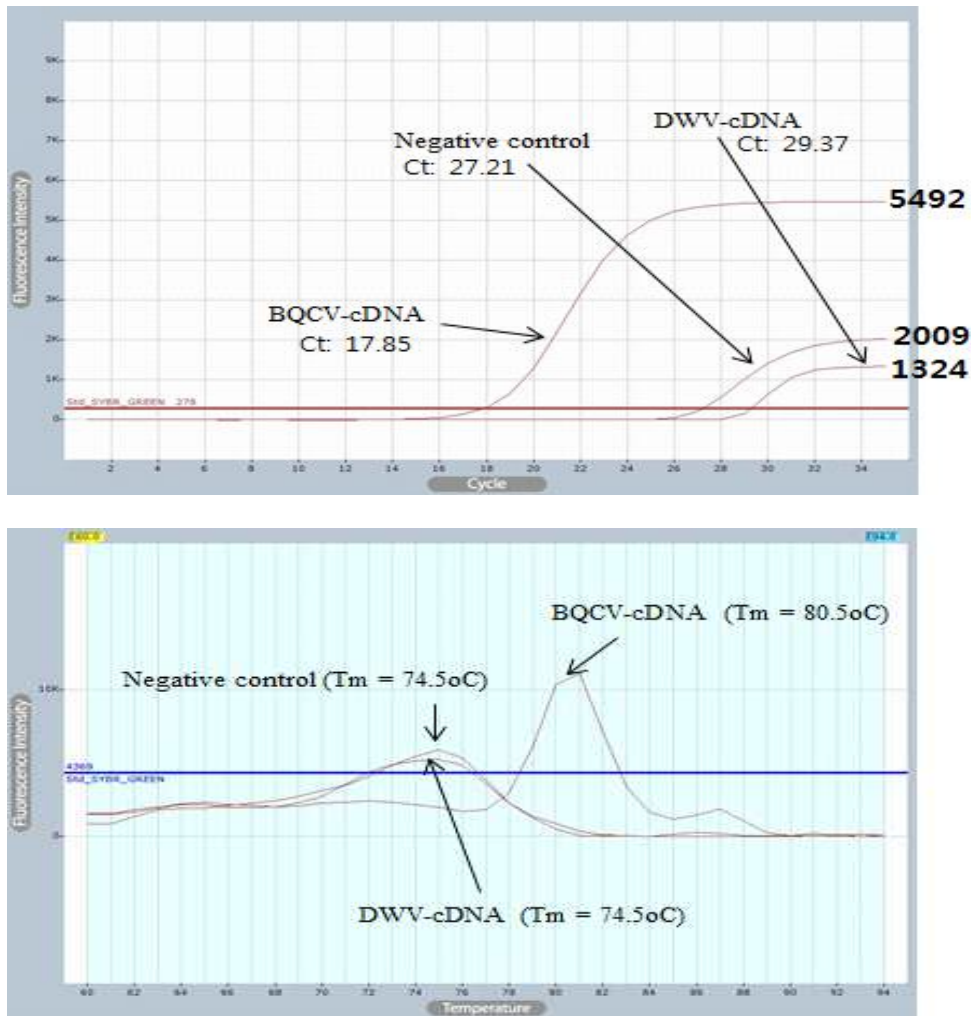


Fig 8. Real-time PCR with cDNAs generated from BQCV-, or DWV-infected honeybee.

The fluorescent graphs of Real-time PCRs with BQCV-cDNA or DWV-cDNA, or without template. The total time of 35 cycles PCR is 90 minutes. Times to Ct values were measured

43 min 51 sec (17.85 cycles), 69 min 12 sec (27.21 cycles), and 74 min 22 sec (29.37 cycles), respectively. (Bottom) T_m (Temperature of mid-point) 80.5°C in PCR product with BQCV-cDNA is identical as T_m of BQCV-specific PCR product.

BQCV, 또는 DWV에 감염된 꿀벌로부터 각각 cDNA를 합성하여, 각각 주형으로 BQCV 특이 Real-time RPA와 BQCV 특이 Real-time PCR을 수행한 결과 두 방법 모두 BQCV-cDNA 주형에서만 BQCV 특이 DNA의 증폭이 이루어지는 것으로 확인되었으며, DWV-cDNA 등 BQCV 주형이 없는 경우 비특이적 DNA 증폭만이 약하게 관찰되었다.

그러나, 특이 DNA 증폭을 인지한 시간은 Real-time RPA에서 5분 53초, Real-time PCR에서는 43분 51초로, 두 반응 간 매우 큰 시간차가 있음을 보여 주었다. 또한 Real-time RPA에서는 전기영동의 결과 없이 형광 그래프만으로 비특이적 DNA 증폭과 특이적 DNA 증폭을 구분할 수 있는 융점분석법과 같은 새로운 척도를 개발하는 것이 매우 요긴할 것으로 사료되었다.

라. 전체 RNA에서 One-step Reverse transcription RPA (one-step RT-RPA)에 의한 BQCV 검출

꿀벌의 병성시료로부터 전체 RNA를 순수분리하고 이후 Real-time RPA 반응을 신속하게 진행하기 위하여 BQCV 특이적인 통합 역전사 실시간 RPA (BQCV-specific One-step Reverse transcription Real-Time RPA; RT/RT-RPA)방법을 개발하였다. BQCV에 감염된 꿀벌로부터 전체 RNA를 추출하였으며, 그 중 1 μ g의 RNA를 주형으로, 200 unit의 M-MLV reverse transcriptase를 RPA solution과 동일하게 조성하여 one-step으로 37°C에서 40분간 반응을 진행하였다.

BQCV-specific one-step RT/RT RPA에서는 8분 36초 (8.61 cycles)에서 BQCV에 특이적인 DNA의 증폭을 확인할 수 있었으며, 주형이 없는 negative 반응에서는 23분 33초 (23.56 cycles)에서 약한 비특이적 DNA의 증폭이 확인되었다. 최종 형광값은 각각 1181, 353으로 측정되었다 (Fig. 9).

이로써 One-step RT/RT RPA를 이용한 전체 RNA를 주형으로 한 BQCV 검출이 가능한 것이 확인되었으며 역전사 반응과 RPA 반응을 동시에 진행할 수 있음을 확인하였다.

역전사 반응을 RPA 반응과 동일한 온도인 37°C에서 동시에 진행한 것은 기기의 단순화와 검색에 소요되는 총시간의 단축을 추구한 것이다. 이는, 현장에서 활용될 수 있는 보다 신속한 전체 RNA 분리기법만 구비된다면, 병원체의 검색에서 바로 현장실험을 추구할 수 있는 장점을 보인 것으로, 양봉현장에서 바로 감염이 의심되는 꿀벌로부터 total RNA추출, BQCV 특이 통합 역전사 실시간 RPA법을 시행할 수도 있을 것으로 기대한다.

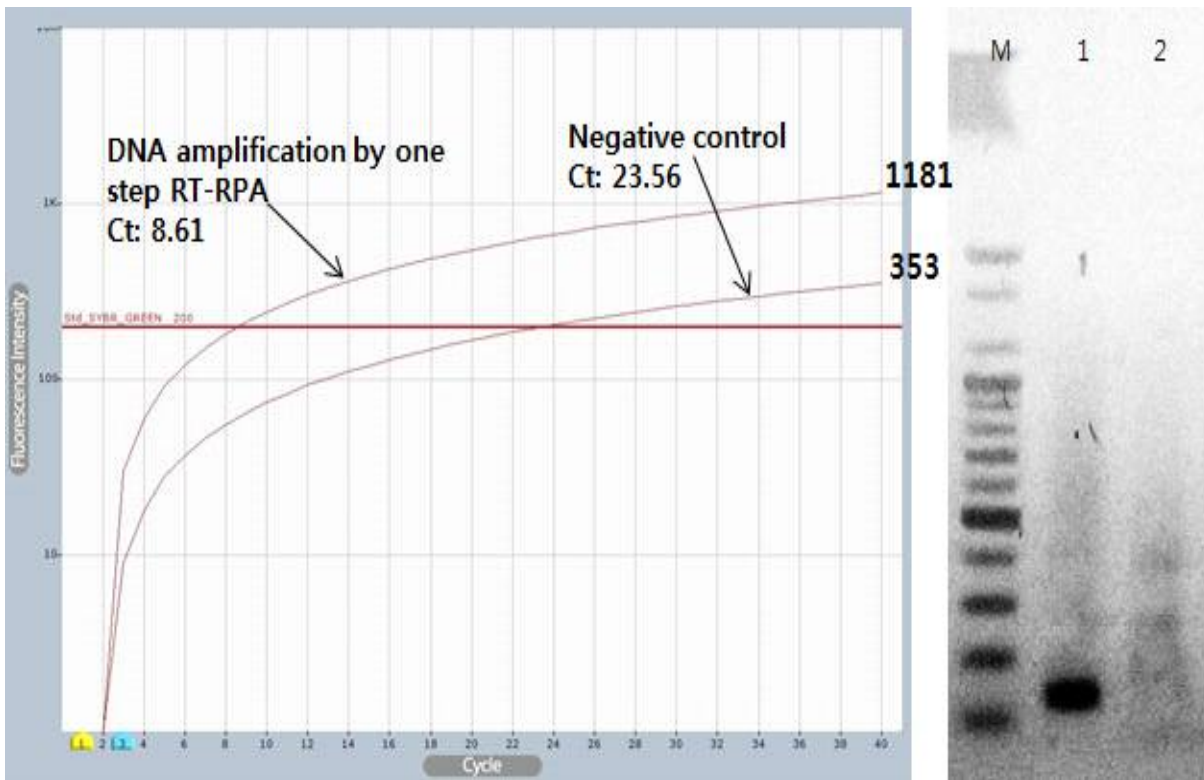


Fig 9. One-step Reverse Transcription Real-Time RPA (RT/RT RPA) assay.

For the detection of BQCV, BQCV-specific one-step RT/RT RPA were performed with total RNA from BQCV-infected honeybee. With total RNA or without template, 8.61 cycles (8 min 36 sec) or 23.56 cycles (23 min 33 sec) were recorded using BQCV-specific RT/RT-RPAs. 131 bp long BQCV-specific DNA was observed only in RT/RT-RPA product with BQCV-total RNA (lane 1; right).

마. RPA에서 항온기기 간 유연성

RPA 반응은 37°C의 등온조건 하에서 이루어 졌으며, 여러 가지 서로 다른 기기를 사용하여 같은 BQCV-specific RPA반응을 수행하였다. 사용된 기기는 항온수조, Heat block, PCR 기기 등 이었으며 추가적으로 실온반응도 진행하였다. 총 40분간 각기 다른 기기 (온도) 환경에서 반응을 진행하였으며, 반응 이후 각 RPA산물은 동량씩 1.5% agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

결과는 37°C의 항온수조를 사용하였을 때, 131bp의 BQCV 특이적인 DNA 밴드가 가장 진하게 나타났으며, 37°C에 맞춘 heat block 및 PCR 기기에서도 항온수조를 이용한 반응과 비교하여 상대적으로 약하나 BQCV 특이 DNA band가 관찰되었다. 실온에서 수행한 RPA와 주형 없이 수행한 RPA 반응에서는 어떤 증폭 산물도 확인할 수 없었다(Fig 10).

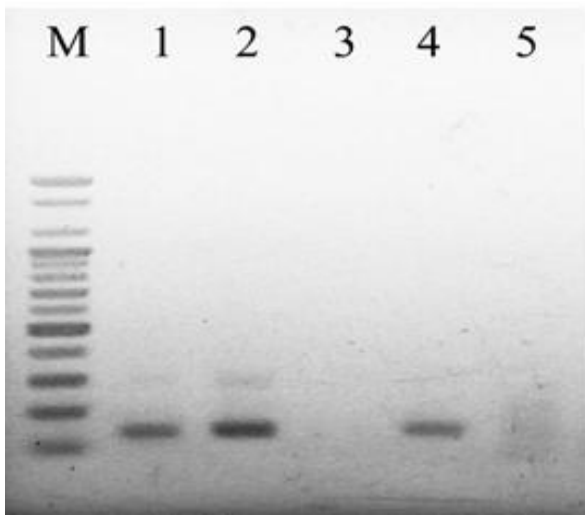


Fig 10. BQCV-specific RPAs using different incubation devices.

Lane 1 to 4 were RPA products using 37°C heat block, 37°C water bath, at room temperature (25°C) and Real-Time PCR machine, respectively. Without template, same RPA reactions were performed in 37°C water bath (lane 5). 131bp long BQCV-specific DNA were observed only in lane 1, 2, 4, respectively.

4. 결론 및 요약

여왕벌 흑색병 바이러스(BQCV)는 꿀벌의 바이러스성 병원체로, 역전사 실시간 중합효소연쇄반응(RT/RT PCR)에 의해 검출된다. 본 연구는 BQCV의 검출에 Recombinase polymerase amplification (RPA)법을 적용하였으며 BQCV 특이적인 실시간 RPA법을 응용하여 BQCV에 특이적인 역전사 실시간 DNA 증폭 기법을 새로이 개발하였다.

Real-time RPA는 37℃ 등온조건에서 40분간 수행하였으며 특이 DNA 증폭은 형광 감지기로 실시간 측정하였다. Real-time RPA에 의한 BQCV 특이적인 DNA 증폭은, RPA 반응시작 3분 26초 만에 검출할 수 있었으며, 동량의 초기주형을 사용한 Real-time PCR은 41분 42초의 시간이 소요되었다. BQCV에 감염된 꿀벌에서 합성된 cDNA를 주형으로 한 Real-time RPA에서는 4분 18초에 유전자 증폭이 인식된 반면, 동량의 같은 주형을 사용한 Real-time PCR은 66분 5초의 시간이 소요되었다. 나아가, BQCV에 감염된 꿀벌로부터 분리한 전체 RNA를 주형으로 역전사효소와 RPA 용액을 혼합하여 실시한 통합 역전사 실시간 RPA (one-step RT/RT RPA)는 8분 36초에서 BQCV 특이적인 DNA의 증폭을 확인할 수 있었다.

제 10 절 꿀벌 병원성 바이러스의 정량적 검출을 위한 정량 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법의 개발

<본 절의 내용은 *Journal of Apiculture* 31(2): 147-156 (2016)에 Development of Quantitative Real-time Recombinase Polymerase Amplification (qRT-RPA) Method for Quantitative Detection against Pathogenic Virus in Honeybee의 제목으로 발표된 것임>

1. 서론

2010년 이래 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 (korean Sacbrood virus; kSBV)는 국내의 토봉 (*Apis ceranae*)를 95%이상 폐사시킨 것으로 알려져 있으나, 국내 서양종 꿀벌 (*Apis mellifera*)는 이에 대한 저항성을 가지고 있어, 다행히 국내 양봉의 치명적 몰락을 피할 수 있었다. kSBV의 발생은 꿀벌의 병원성 바이러스에 대한 제어방법을 진지하게 고민하게 하였으며, 우선, 특정 바이러스의 검출법은 해당 바이러스에 대한 정보 축적의 가장 기초적인 도구이기에, 간편하고 정확한 그리고 정량적 검출이 가능한 검출법에 대한 개발 보고는 고무적인 것이라 할 것이다 (유 등, 2009; 2010; 이 등, 2011; Han *et al.*, 2011).

현재 꿀벌바이러스 검출법은 polymerase chain reaction (PCR)법을 기반으로 한 다양한 유전자 검사법이 사용되고 있으며, 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR; qPCR)법이 민감성과 정확성의 면에서 거의 표준적 실험법으로 인식 되고 있다. 그러나 이 실험법은 고가의 장비가 필요하여 현장성에서 약점을 보이고 있으며, 검사 시간이 오래 걸리는 단점을 가지고 있다.

한편, Recombinase polymerase amplification (RPA)는 PCR법과 다르게 등온 조건에서 특정 유전자의 염기서열을 증폭시키고, 보다 빠르게 유전자 증폭시킬 수 있는 실험법으로 주목을 받고 있다. 즉, RPA법은 recombinase인 uvsX와 co-factor, oligo-nucleotide primer와 결합하는 uvsY, DNA 신장하는 *Sau* polymerase를 사용하여 37°C 등온에서 반응을 진행하며, 총 반응시간은 40분 내외가 추천되고 있다(Piepenburg *et al.*, 2006). 현재 RPA 방법에 의한 다양한 병원체의 검출법들이 계속 보고되고 있으며, 우수한 유전자 진단법으로 점차 적용범위를 넓혀 나아가고 있다.

병원체 검출법으로써 RPA법의 강점은 신속성과 37°C 등온반응이라는 현장적용성이라 할 것이다. Xia 등 (2014)은 infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus를 7분 이내

에 검출한 것을 보여준 바 있다. 최근, 꿀벌 바이러스인 black queen cell virus (BQCV)의 검출에 real-time RPA법을 적용한 결과는 3 분 26 초 만에 빠른 target gene 검출을 확인하였고, 시료로부터 추출한 total RNA로부터 8 분 36 초에 target gene의 검출이 확인됨을 보고하였다(임 등, 2016).

한편, RPA법을 사용하여 병원체의 양을 정량하는 것은, RPA법의 빠른 반응속도 등의 이유로 용이하지 아니한 면이 있다. Xia 등 (2014)은 IHNV (infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus)의 검출에서, fluorophore로 6-carboxyfluorescein FAM을, quencher로 BHQ-1(black hole quencher 1)을, spacer로 THF (tetrahydrofuran spacer)를 사용한 real-time RPA법을 제시하였으나, 정량 실험 결과에서 회귀상수 R^2 값 0.943이었음을 보여주었다. 또한, shrimp white spot syndrome virus의 검출에 사용된 real-time RPA는, 정량실험결과, R^2 값이 0.90이었음을 보여주어 정확한 정량이 어려움을 나타내었다(Yang *et al.*, 2015).

따라서 본 연구에서는 kSBV 특이 유전자를 빠르게 검출할 수 있는 real-time RPA 방법을 새로이 개발하고자 하였으며, 아울러 모든 특이 유전자의 양을 정량적으로 검출할 수 있는 새로운 정량 실시간 RPA법을 확립하여 보편화 시키고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 질병시료 및 꿀벌 바이러스의 특이 재조합 DNA들

본 연구에 사용된 질병시료는 kSBV (korean sacbrood virus)에 감염이 확인된 토종벌의 유충이었다. 이 유충들은 경기대학교 양봉장 소재 토봉(*Apis ceranae*)의 봉군에서 일벌에 의해 소문 밖으로 배출된 유충을 채집한 것이며, kSBV-특이 실시간 PCR법에 의하여 kSBV가 우점하고 있음이 확인된 것이다.

kSBV 특이 염기서열을 포함한 재조합 DNA는 pGEM-kSBV-VP1이며, GenBank의 HQ322114의 염기서열 823-1351의 528염기를 포함하고 있으며, 이는 capsid protein 유전자의 일부이다. 또 다른 재조합 DNA인 pGEM-BQCV-*vp3*는 BQCV의 VP3유전자가 탑재된 재조합 DNA이다 (Giang *et al.*, 2015). 이들을 본 연구에서 주형으로 사용하였다.

나. Total RNA isolation 과 cDNA 합성 (Reverse transcription)

토종벌의 유충 시료 1마리를 1.5ml tube에 넣고 homogenizer로 분쇄한 후, R&A-Blue™ (iNtRON, Korea) 1ml, chloroform 200 μ l을 넣고 vortexing으로 혼합하였으며, 이를 13,000 rpm, 4°C 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상등액에 존재하는 total RNA를 spectrophotometer로 정량하였고, -70°C에 보관하며 사용하였다.

cDNA 합성은 total RNA를 1 μ g을 사용하였고, oligo dT를 사용하였다. 2.5mM dNTP, 100mM DTT, 1x RT-buffer, MML-V reverse transcriptase (Bioneer Inc, Korea)를 사용하였으며, 37 °C에 30 분 정치시켜 cDNA를 합성하였다. 이후 94°C, 5 분으로 효소 활성을 정지시켰다.

다. RPA 및 real-time PCR용 Primer 설계 및 제작

kSBV (Genbank Accession Number. HQ322114)의 genome structure 내부 open reading frame (ORF) 중 capsid protein을 암호화하는 위치로 특이 primer 쌍을 제작하였다(Fig 1; Table 1).

BQCV의 경우, Genbank Accession Number. KR074231의 정보를 근거로 구조 단백질 VP3 유전자를 증폭할 수 있는 BQCV-VP3-RPA-F1/R1을 제작하였다(Table 1).



Figure 1. Location of primers in korean Sacbrood virus genome (Genbank accession Number HQ322114).

PCR product using kSBV-RPA primer set was located at 914 - 1034 bp in HQ322114

Table 1. Oligo-nucleotide primer sets about kSBV and BQCV specific target gene

Target	Primer	Sequence (5'→3')	Length (mer)	Tm (°C)	Product size (bp)	Reference
kSBV	kSBV-RPA-F	CTTACGCTAAGTGCGCGCCCAATACTA TAC	30	66	121	This study
	kSBV-RPA-R	GAAACAATAACTTTCCCGCACTGAAAC TTA	30	60		
BQCV	BQCV-VP3-RPA-F1	CTGGGCGGACATCTACCTTTCCTCAAA TAC	30	64	147	
	BQCV-VP3-RPA-R1	TAAAACGGTGGGATTGGCAATGGGTAA GAG	30	64		

라. Real-time recombinase polymerase amplification (RT-RPA)

RPA는 Twist Amp® Basic kit (TwistDx, UK)를 사용하여 수행하였다. RPA는 먼저 reaction mix를 제조하였으며, freeze-dried reaction과 280 mM Magnesium acetate를 제외한 나머지 즉, 각 2.4 pmole primer (kSBV-RPA-F/R), 1x rehydration buffer, 1x sybr green (Bioneer, Korea)을 혼합한 후, freeze-dried reaction의 tube로 옮겨, pipetting 혼합 제조하였다.

이 reaction mix는 RPA반응의 시작 직전에 real-time PCR용 tube로 옮겼으며, 필요량의 Magnesium acetate (MgOAc)를 tube 뚜껑내부에 loading하여 반응시작 시각을 정확히 하려 하였다(최종 농도 14mM Magnesium acetate의 RPA의 경우, RPA용액은 9.0 µl, 뚜껑에 1.0 µl 140 mM MgOAc를 넣어 합하여 사용함).

RPA는 일반적으로 제작사의 추천방법과 동일하게 수행하였으나, 반응 부피는 최종 10µl로 축소하여 실시하였다. 최종 1x sybr green을 첨가한 것은 RPA 반응을 실시간으로 monitoring 하고자 한 것이며 반응의 전 과정은 Exicycler quantitative thermal block™ (Bioneer, Korea)에서 수행하여, 형광값으로 나타나는 DNA 산물의 증감을 실시간으로 측정 하였다.

반응시간을 정확히 측정하기 위하여, Exicycler의 온도/시간 조건을, 37 °C의 등온, 20초를 1 cycle로 설정하였다(반응시간 20 분 = 60 cycles).

마. Specific-kSBV real-time RPA의 신속 검출법 개발

kSBV의 감염의심 되는 유충시료로부터, total RNA를 추출하였고, 그 중 1 μ g을 사용하여 cDNA로 제작하였다. 제작된 cDNA를 주형으로 specific-kSBV real-time RPA 방법을 사용하여 target gene을 검출하였다. Real-time RPA 반응은 exicyclerTM quantitative thermal block (Bioneer, Korea)를 사용하여 형광 값을 측정하였고, 1 cycle을 20 초로 하여 시간 변화에 따라 형성되는 그래프를 확인하여 주형 DNA의 검출을 실시간 측정하였다.

바. Specific-kSBV real-time RPA의 민감도 측정

주형 DNA의 연속희석을 통하여 7.55 x 10⁶에서 7.55 x 10² 분자를 각기 RPA에 사용하였다. Quantitative real-time RPA는 exicyclerTM quantitative thermal block (Bioneer, Korea)를 사용하여 형광 값을 시간에 따라 측정하였다. 주형 DNA의 양에 따른 정량 곡선은 threshold time line을 통하여 회귀 상수 값으로 변환하여 정량을 측정하였다.

다른 주형을 사용한 정량성의 검사에서, 주형 DNA인 pGEM-BQCV-vp3를 2.32 x 10⁸에서 2.32 x 10⁴분자까지 연속 희석하여 동일한 방법으로 real-time RPA를 진행하여 정량을 측정하였다.

사. Primer 농도 조정에 따른 RT-RPA 형광그래프의 변화

Real-time RPA 반응에서 specific primer 농도를 조절하여 RPA의 변화를 형광그래프로 측정하였다. Primer 농도는 최종농도 0.96 μ M, 0.48 μ M, 0.36 μ M, 0.24 μ M, 0.12 μ M로 각기 다르게 하였으며, 주형인 pGEM-kSBV-vp1은 7.55 x 10⁶에서 7.55 x 10³ 분자를 정량, 희석하여 각기 RPA에 사용하였다. Real-time RPA 반응은 exicyclerTM quantitative thermal block (Bioneer, Korea)를 사용하여 형광 값을 측정하였다.

아. Magnesium acetate 농도 조정에 따른 RT-RPA 형광그래프의 변화

Real-time RPA 반응에서 magnesium acetate의 농도를 조절하여 RT-RPA의 변화를 형광그래프로 측정하였다. Magnesium acetate의 농도는 14 mM, 10 mM, 7 mM, 3.5 mM로 점차 줄여 RT-RPA 반응을 진행하였으며, 주형으로 pGEM-kSBV-vp1를 7.55 x 10⁶ 에서 7.55 x 10³ DNA 분자, pGEM-BQCV-vp3를 2.32 x 10⁸에서 2.32 x 10⁴ 분자까지 희석하여 사용하였다.

자. kSBV 질병시료를 사용한 qRPA와 qPCR의 정량성 비교.

건강한 토봉 애벌레, 감염 의심 애벌레를 각각 육안으로 판별하여, 시료를 S1, S2, S3로 구분하였다. 각 시료로부터 total RNA를 추출하여 약 150 μg 을 각기 확보하였으며, 그 중 1 μg 을 사용하여 cDNA 20 μl 로 제작하였다. cDNA 1 μl 를 각기 주형으로 사용하여 kSBV-specific, 정량 real-time RPA 방법과 정량 real-time PCR 방법을 각기 사용하여 kSBV 특이 DNA의 정량성을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

가. kSBV 신속 검출을 위한 kSBV 특이 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법 (specific-kSBV real-time RPA)의 개발

kSBV의 감염이 확인된 실제 시료로부터, total RNA를 추출하였고, 그 중 1 μg 을 사용하여 cDNA로 제작하였다. 제작된 cDNA를 주형으로 kSBV-specific real-time RPA 방법을 사용하여 target gene을 검출하였다.

반응 시간은 총 20 분이 소요되었고, cDNA로부터 검출에 소요된 시간은 2 분 46 초 (Tt값 8.62)에서 kSBV 유전자의 증폭 및 검출이 확인되었다. Positive control로 사용된 kSBV-specific DNA에서는 53 초 (Ct값 4.66)만에 kSBV 특이 DNA 증폭이 측정되었다(Fig. 2).

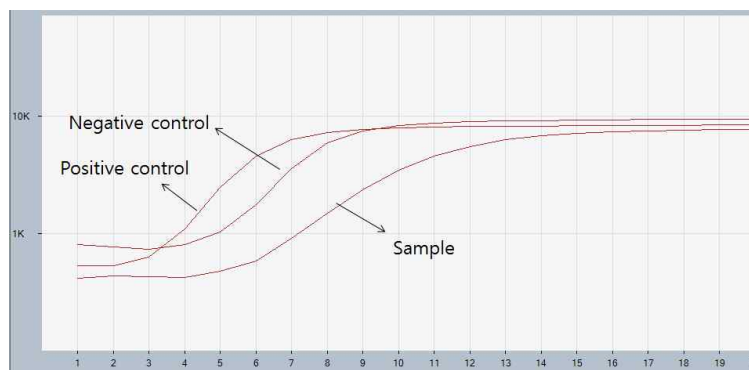


Figure 2. Detection of kSBV-specific DNA by using kSBV-specific real-time RPA with cDNA generated from kSBV infected larvae samples

kSBV-specific real-time RPA was performed in 20 minutes. Amplification of kSBV-specific DNA could be recognized on 2 minutes 46 seconds after beginning. 7.55×10^5 molecules of pGEM-kSBV-vp1 were used for positive control and distilled water was used for negative control.

나. kSBV 특이 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법의 민감도 측정

주형 DNA의 연속회색을 통하여 kSBV-specific real-time RPA의 민감도를 측정하였다. Real-time RPA의 초기주형이 7.55×10^3 분자 이상일 때 형광값의 증가에 의하여 증폭되는 것으로 측정되었으나, 증류수를 사용한 negative control에서도 증폭이 확인되고, 오히려 7.55×10^3 분자의 결과보다 더 빠른 증가양상을 보여주었다(Fig. 3A).

그러나, 용점분석(Melting temperature analysis)에서 증폭된 DNA 산물의 분석결과, 초기주형 7.55×10^4 분자 이상을 사용한 증폭산물들은 동일한 84.5°C의 Tm (Temperature of midpoint)를 나타낸 것에 반하여, 초기주형 7.55×10^3 분자를 사용한 증폭산물은 Tm값이 2.0°C 이상의 차이를 보이며, 또한 그래프의 형태도 전형적 비특이적 증폭산물임을 보여주었다(Fig. 3C).

따라서, kSBV real-time RPA는 초기주형 $7.55 \times 10^6 - 7.55 \times 10^4$ 분자범위에서 정량이 가능함을 보여주었고, 이 범위에서 회귀상수(Regression coefficient), R^2 값은 0.9997 로 높은 정량성을 보여주었다(Fig. 3B).

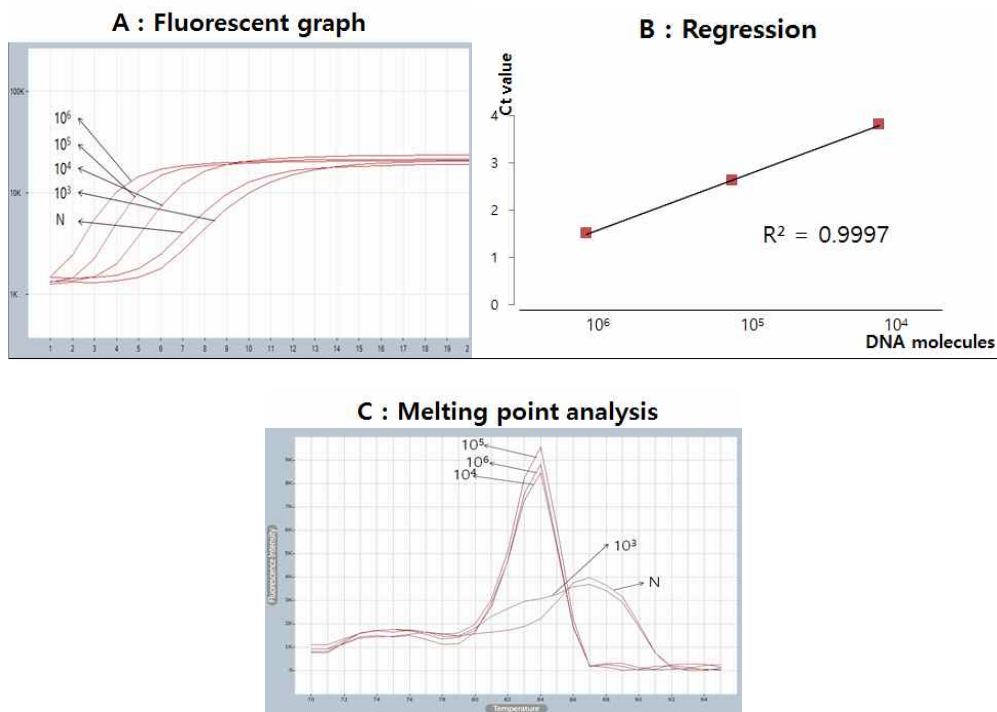


Figure 3. Detection limit of kSBV-specific real-time RPA.

7.55×10^6 to 7.55×10^3 molecules of pGEM-kSBV-vp1 were amplified by Using kSBV-specific real-time RPA. Regression coefficient (R^2) was calculated as 0.9997 and Tm value of target gene was estimated 84.5°C from all RPA products except for negative control.

다른 주형을 사용한 정량성의 검사에서, 주형 DNA인 pGEM-BQCV-vp3 DNA를 2.32×10^8 분자에서 2.32×10^4 분자까지 연속 희석하여 real-time RPA를 진행한 결과, 정량이 가능함을 확인 할 수 있었다. 증폭산물을 용접분석으로 측정된 Tm값은 모두 87.5°C로 일치하였으며, $2.32 \times 10^8 - 2.32 \times 10^4$ 분자범위에서 회귀상수 R²값은 0.9861로 역시 높은 정량성을 보여 주었다(Fig. 4).

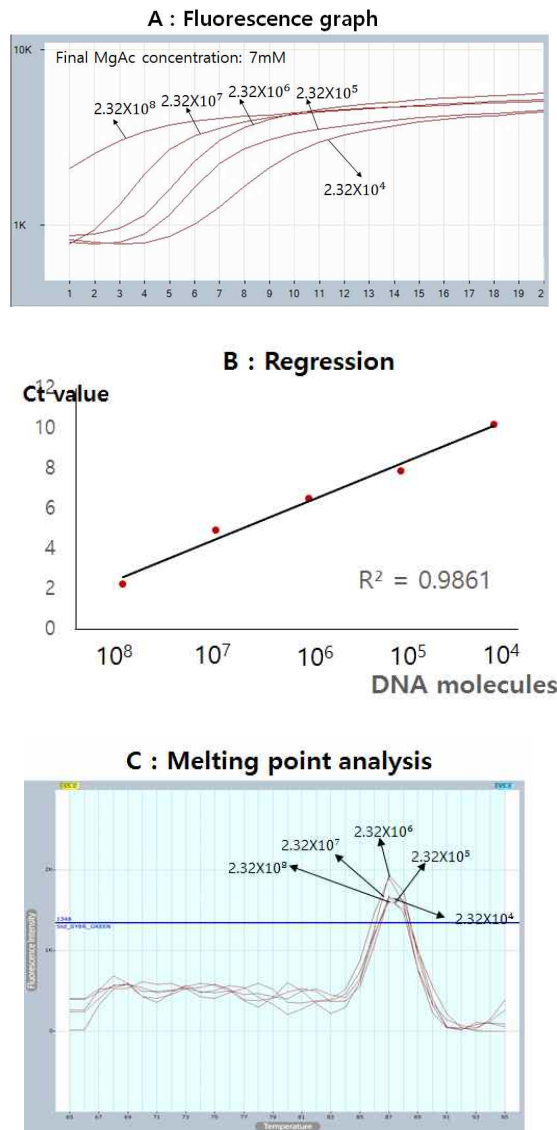


Figure 4. Detection limit of BQCV-specific real-time RPA.

2.32×10^8 to 2.32×10^4 molecules of pGEM-BQCV-vp3 were amplified by Using BQCV-specific real-time RPA. Regression coefficient (R²) was calculated as 0.9861 and Tm value of target gene was estimated 87.5°C from all RPA products.

한편, BQCV-RPA 반응 후 용액에 있는 RPA 증폭 산물이 특이 DNA인지를 확인하기 위하여, pGEM-BQCV-VP3를 사용한 실시간 PCR을 시행하였다.

먼저, 초기기질의 Ct (Threshold cycles)값 대비 정량 측정을 위하여, $2.32 \times 10^7 - 2.32 \times 10^0$ 의 pGEM-BQCV-VP3 분자를 주형으로 실시간 PCR을 수행하였으며, 얻어진 Ct값들 을 기지의 초기 기질양에 대비하여, 회귀식 $y = -0.3019x + 11.2239$ 를 산출하였으며, 이의 회귀상수 값은 0.997로 계산되었다.

또한, BQCV-specific real-time RPA solution (최종 농도 7 mM magnesium acetate 사용) 을 $1/10^4$ 에서 $1/10^6$ 으로 희석하여, 이들을 각기 주형으로 real-time PCR을 진행하였으며, 각 RPA 희석액을 주형으로 한 RT-PCR의 Ct값들은 앞에 제시한 회귀식에 대입하여 계산한 결과, 각 RPA 최종 반응 산물 내에는 1.36×10^{12} , 1.94×10^{12} , 3.52×10^{12} , 1.99×10^{12} , 1.92×10^{12} 분자의 BQCV-specific DNA가 존재하는 것으로 측정되었다. 이는 BQCV-specific real-time RPA가 주어진 특이 DNA를 생산하였음을 보여주고, RPA에서 초기 주형량과는 무관하게 10^{12} 수준의 specific DNA로 증폭시킬 수 있음을 보여주었다. 또한 RPA의 최종 형 광값이 특이 DNA의 양을 어느 수준 반영할 수 있음도 보여주었다(Fig. 5).

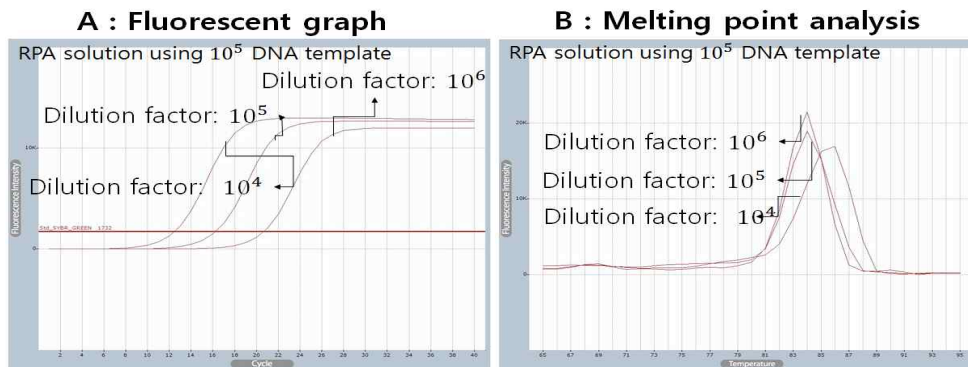


Figure 5. Quantitative real-time PCR using BQCV real-time RPA products

All diluted RPA solutions were amplified by using RT-PCR and the Ct values were 12.45, 16.24 and 20.66 respectively. Tm value of $1/10^6$, $1/10^5$ diluted RPA solutions was estimated 85.5°C and the $1/10^4$ diluted solution showed 84.0 °C Tm value.

다. Primer 농도 감소에 따른 RPA법에서 정량성의 변화

RPA의 빠른 반응 속도는 오히려 초기주형의 양을 정확히 정량하는데 어려움을 주게 된다. 따라서, 반응 속도를 적절히 제어하고자 RPA에서 사용하는 primer 농도를 감소시켜 real-time RPA 반응을 진행하였다.

Primer 쌍의 농도는 최종농도 0.96 μM , 0.48 μM , 0.36 μM , 0.24 μM , 0.12 μM 으로 각각 다르게 사용하였으며, 이로써 반응 속도가 점차 느려짐을 발견하였고, 이 조건에서 초기주형량을 각기 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 분자로 조정하여 Real-time RPA를 수행하고, 각 형광 값의 변화들을 측정하였다. 얻어진 각 형광그래프에서 초기 주형 량 대비 정량성을 알아보기 위하여 각기 회귀상수 R^2 값을 측정하여 비교 분석하였다.

결과로써, primer의 최종농도 0.48 - 0.12 μM 의 범위에서는 회귀상수 R^2 값이 0.96 이상임을 보여주었으며, 그 중 최종농도 0.36 μM 의 primer는 RPA에서 회귀상수 R^2 값이 1.0000 으로 나타나 가장 높은 정량성을 보였다. 따라서 정량 real-time RPA법에서는 반응 속도 면에서 불리하더라도, 높은 정량성을 추구하기 위해서는 primer의 농도를 과량이 아닌 0.36 μM 로 조정하는 것이 최적의 조건으로 판단된다(Fig. 6).

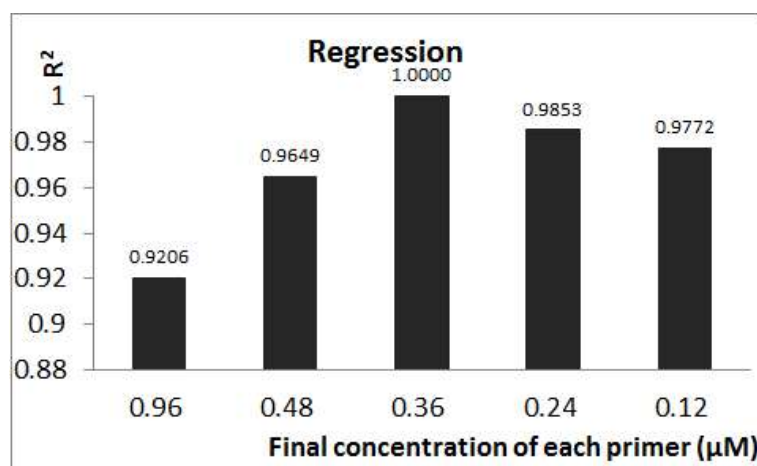


Figure 6. Regression coefficient of kSBV-specific RT-RPA according to different primer concentrations

The regression coefficient values according to different primer concentrations were estimated respectively. The highest value of regression coefficient was showed at 0.36 μM primer concentration.

라. Magnesium acetate 농도 변화에 따른 RPA법에서 정량성의 변화

Magnesium acetate (MgOAc)는 real-time RPA 반응을 시작하게 하는 필수적 요인으로, 반응속도가 매우 빠른 RPA법을 보다 우수한 정량 방법으로 응용하기 위하여 사용되는 MgOAc의 농도를 낮추어 RPA 반응 속도를 제어하고자 하였다. 각 MgOAc 농도에 따라, 초기주형량을 각기 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 분자를 사용하여 Real-time RPA를 수행하였으며, RPA 정량의 결과는 회귀상수 R^2 값으로 측정하여 비교하였다.

MgOAc의 양을 줄여서 RPA정량을 수행하는 것은 10.0mM - 7.0 mM의 범위에서 유효하며, 7.0 mM의 농도에서 회귀상수 R^2 값은 0.9984로 가장 높은 정량성을 보여주었다. (Fig. 7).

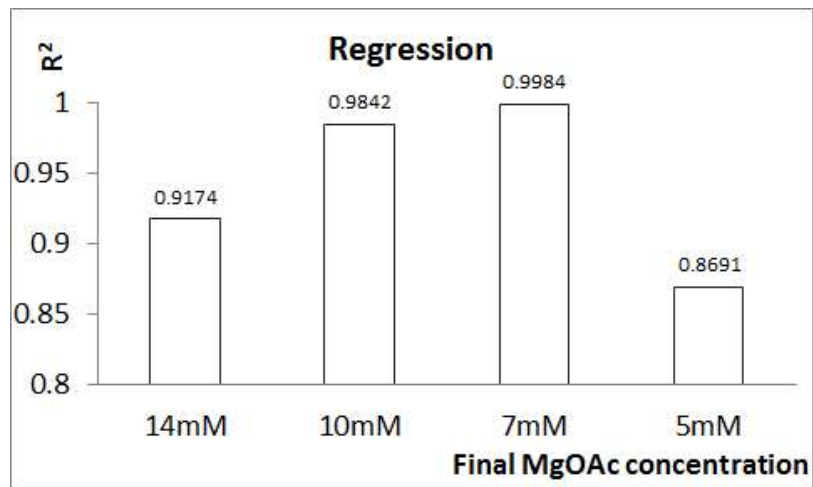


Figure 7. Regression coefficient of kSBV-specific RT-RPA according to different magnesium acetate concentrations.

The regression coefficient values according to different magnesium acetate concentrations were estimated respectively. The highest value of regression coefficient was 0.9984 when using 7mM magnesium acetate.

마. 정량 RPA법의 정립을 위한 Threshold time line (Tt line)의 설정

Real-time RPA의 정량을 보다 정확하게 하기 위하여 threshold line의 위치를 정립하고자 하였다. Threshold time line은 real-time RPA에서 형광값의 증가를 나타내는 각 sigmoid형 그래프의 threshold time을 구하고자 하는 것으로, 특정 형광 값을 기준으로 가로선을 그은 것을 말한다. 이 특정 형광값을 보편화하기 위하여, 먼저, RPA 반응에서 처음 측정되는 initi

al template (I)의 형광 값을 측정하고, 더 이상 형광값이 증가하지 않는 end product (E)의 형광값을 측정한 후, 측정된 양자의 형광값 차이(ΔF)을 구하였다. I와 E의 중간값인 $0.5 \times \Delta F$ 값은 절대값으로 $I + 0.5 \times \Delta F$ 의 형광값이 될 것이나, 편의상 $0.1 \times \Delta F$, $0.2 \times \Delta F$, $0.3 \times \Delta F$, $0.4 \times \Delta F$, $0.5 \times \Delta F$ 등의 형광값을 기준으로 threshold time line을 설정하고, 초기주형량 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 분자를 사용한 RPA형광그래프에 적용하여 어느 threshold time line에서 회귀상수 R^2 값이 가장 우수한지를 비교하였다.

결과로써, $0.1 \times \Delta F$ 부터 $0.7 \times \Delta F$ 의 형광값을 사용한 회귀상수 R^2 은 0.9700 이상의 값을 보였으며, 중간 ΔF 값인 $0.5 \times \Delta F$ 를 선택하는 것이 무난할 것으로 판단되었다(Fig. 8).

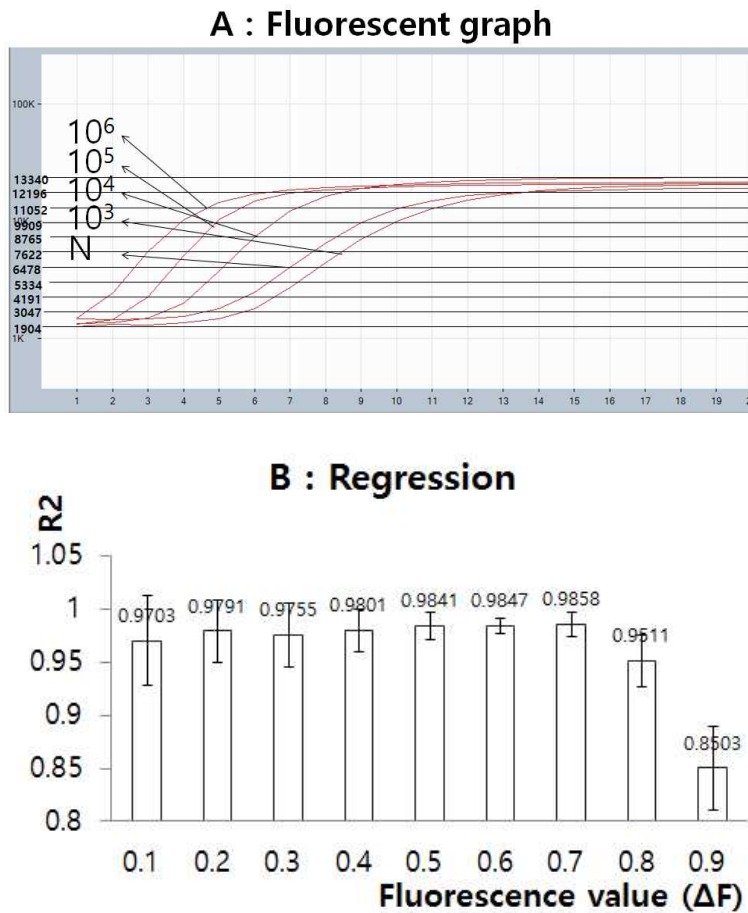


Figure 8. Regression efficiency according to variation of time threshold line (Tt).

Time threshold line was established by using calculated fluorescence noise value.

바. Real-time RPA의 표준 정량법

real-time RPA에서 주형 DNA를 정확히 정량하기 위하여, RPA의 반응 속도를 적당한 수준으로 제어하는 것은 필요하다. 이에 본 연구는, 정확한 정량을 위하여 real-time RPA에 중요 요소인 primer의 농도 또는 Magnesium acetate의 농도를 감소시켜 RPA 반응 속도를 제어하게 되었다. 즉, 정확한 정량을 위한 real-time RPA를 위하여, 최종농도 0.12 - 0.36 μM primer사용이 유리하며, 과량인 최종농도 14 mM Magnesium acetate보다 최종농도 7.0 mM Magnesium acetate하에서 반응을 시작하여 정량치를 측정하는 것이 보다 유리하다는 것이다.

또한, 형광그래프로부터 threshold time line을 사용하여 정량치를 측정하되, 그 기준이 되는 형광값의 위치는, 최종형광값(end product; E)과 초기형광값(initial template; I)의 차이인 형광값의 변화량(ΔF)의 1/2의 형광값, 즉 $1/2x \Delta F$ 이며, 이 기준이 가장 실시간 RPA정량에 유리한 것으로 나타났다.

사. 꿀벌 애벌레 감염 증상에 따른 kSBV 검출확인

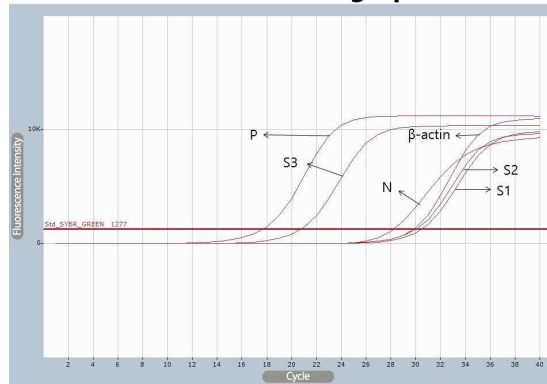
토봉(*Apis ceranae*)의 봉군에서, 외형상 건강한 유충, kSBV 감염 의심 유충, kSBV 감염 확실 유충을 각각 채집하여 이를 각각 S1, S2, S3로 구별하였다.

각 시료로부터 total RNA를 추출하여 각기 약 150 μg 을 확보하였고, 그 중 1 μg 을 사용하여 cDNA 20 μl 로 제작하였다. 제작된 cDNA 1 μl 를 각기 주형으로 사용하여, kSBV-specific real-time PCR법과 kSBV-specific real-time RPA법을 각각 적용하였고, 그 정량성을 비교하였다.

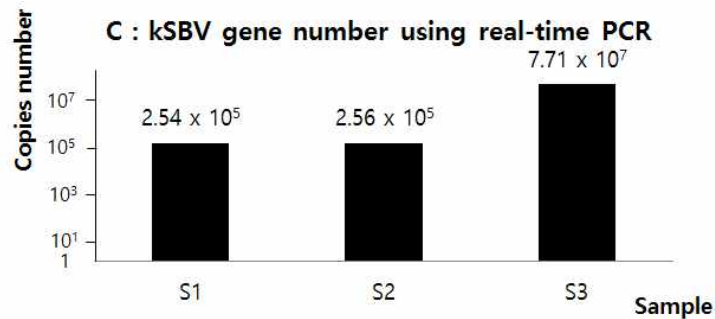
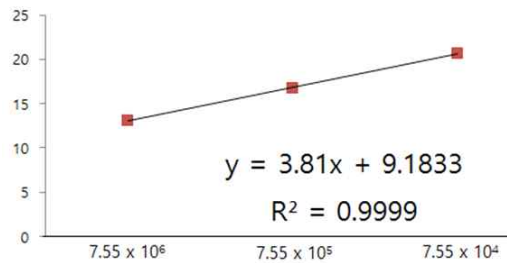
Real-time PCR방법으로 kSBV-specific DNA 수를 측정한 결과, S1 은 2.54×10^5 , S2 는 2.56×10^5 , S3 는 7.71×10^7 분자수가 측정되었다. (Fig. 9).

이는 우선 육안 판정에 의한 kSBV 감염시료가 건강해 보이는 유충시료보다 약 300배 이상 많은 kSBV를 가지고 있다는 것이며, 또한 동일 봉군내 건강 유충도 kSBV를 다량 보유하고 있다는 사실을 알 수 있다.

A : Fluorescence graph



B : Regression



D : kSBV infected larvae ; sample 1,2,3



Figure 9. Quantitative detection of kSBV target DNA by using real-time PCR

Using quantitative real-time PCR, kSBV was detected from all larvae samples(S1-S3). The Regression coefficient of standard curve graph was measured as 0.9999. The target DNA copies of kSBV were estimated as 2.54×10^5 , 2.56×10^5 , 7.71×10^7 respectively.

한편, Real-time RPA법으로 kSBV-specific DNA수를 측정된 결과, 토봉 유충에 따라서 S1 은 1.86×10^6 , S2 는 1.88×10^6 , S3 는 9.06×10^8 수가 측정되었다(Fig. 10).

실시간 PCR 및 실시간 RPA에서 정량의 기준으로 사용된 초기 주형량은 각기 7.55×10^4 , 7.55×10^5 , 7.55×10^6 으로 동일한 분자수를 사용하였으며, 전자의 회귀상수 R^2 의 값은 0.9999, 후자의 회귀상수 R^2 의 값은 0.9928으로 거의 대등함을 보여주었다.

그러나, 양자간 산출된 kSBV 특이 분자들의 수는 건강해 보이는 유충시료 S1에서, RPA결과는 PCR결과에 비하여 7.3배 높은 측정치를 보여주었으며, kSBV 감염 확실 유충시료 S3에서도, RPA결과는 PCR결과에 비하여 11.8배의 높은 측정치를 보여주었다. 이런 양자간의 차이는 형광값 측정의 차이에서 기인하는 것으로 해석하며, 보다 비특이적 증폭이 많이 발생하는 RPA에서 보다 높은 형광값이 측정된 것이 아닌가 추측한다(Fig. 9; Fig. 10).

같은 시료로부터 Real-time PCR법과 real-time RPA법을 각기 사용하여, 동일 target DNA의 정량결과는, real-time RPA을 사용하는 것이 보다 빠른 시간에 정량결과를 볼 수 있으나, 민감도와 정량적 검출에서 약간의 손실이 있음을 보여주며, 절대 정량치에서 RPA에 의한 분자수 측정은 비특이적인 산물의 증산으로 인하여 형광값의 비정량적 증가가 있지 않았을까 추측한다.

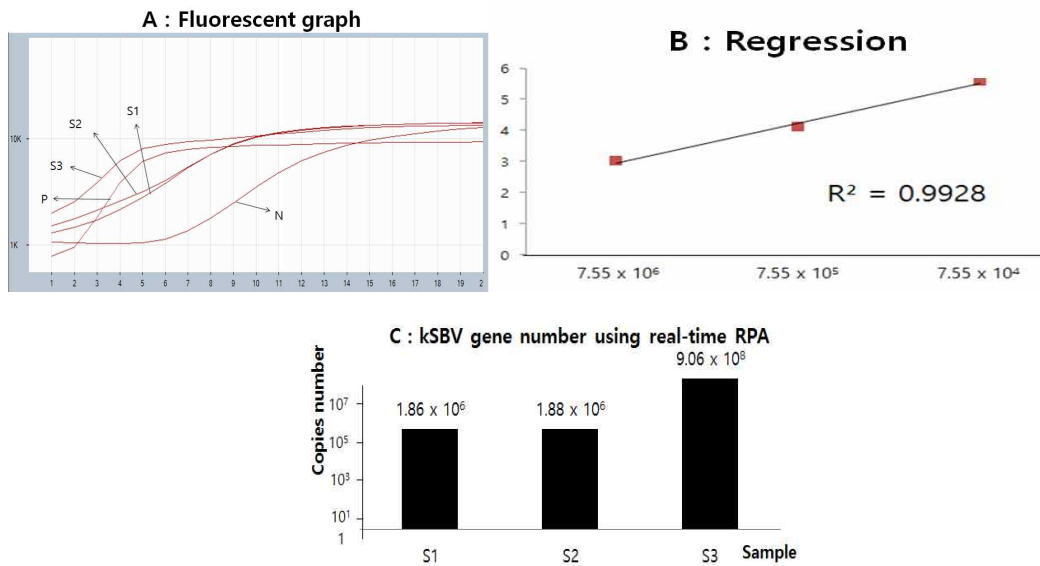


Figure 10. kSBV-specific Quantitative real-time RPA with infected larvae of *Apis cerana*

From the infected larvae samples which were used for RT-PCR, kSBV target DNA was also estimated by kSBV specific real-time RPA. The Regression coefficient of standard curve graph was measured as 0.9928 and the target DNA copies of kSBV were estimated as 1.86×10^6 , 1.88×10^6 , 9.06×10^8 respectively.

4. 결론 및 요약

Recombinase polymerase amplification (RPA)은 등온에서 매우 빠른 반응속도를 보이는 유전자 증폭법으로 근래 여러 병원체의 검출법에 폭넓게 적용되고 있다. 본 연구는 kSBV의 빠른 검사를 위하여 kSBV 특이 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법을 새로이 개발하였으며, 특이 cDNA로부터 2분 46초 만에 kSBV특이 유전자의 존재를 확인할 수 있었다. 또한, 이를 바탕으로 목적 유전자의 정량이 가능한, 보편적 응용이 가능한 정량 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법(quantitative real-time RPA)을 제안하였으며, 이 정량법이 현장시료에서 유용함을 입증하였다. 본 실험법은 꿀벌 질병체의 정량 검출 뿐 아니라, 일반 병원체의 정량 검출에서도 응용되기를 기대한다.

제 11 절 뒤영벌 병원체에 대한 다중 실시간 초고속 PCR의 개발 및 PCR chip의 제품화

1. 서론

서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)은 벌목 꿀벌과의 곤충이다. 유럽이 원산지이며 한국에는 자원곤충으로 도입되었다. 뒤영벌은 딸기, 토마토, 참외 등의 재배에서 화분매개곤충으로 사용되며 시설채소 농법 발달에 큰 변화를 일으키고 있다(Woo and Lee., 1996). 최근에는 여러 나라들에서 화분매개를 위한 뒤영벌의 수출입이 빈번하게 일어나고 있다.

2009년 최 등의 논문에서는 국내 최초로 서양뒤영벌에서 Deformed wing viurs (DWV)를 정량적으로 검출한 바 있었으며, 이외에도 수입된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에서 기생성 응애가 발견되고 그 심각성이 보고된 바 있다(Schmid-Hempel, 2001). 국내에서는 실내사육 중인 호박벌(*Bombus ignitus*)의 유충에서 석고병균(*Aspergillus flavus* Link)이 분리된 바가 있었다(남 등, 2003), 또한 최 등 (2010)에서는 꿀벌의 바이러스가 뒤영벌류에 교차 감염되는지 여부를 확인하였으며 그 결과 국내의 서양뒤영벌에서 7종의 바이러스가 교차 감염되는 것을 처음으로 확인하였다.

본 연구에서는 서양뒤영벌의 병원체 13종(즉, Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), BQCV (Black Queen Cell Virus), CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus), DWV, IAPV (Israel Acute Paralysis Virus), KBV (Kashmir Bee Virus), SBV (Sacbrood Virus), kSBV (korean Sacbrood Virus), *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), *Mellisococcus plutonius* (*M. plutonius*)와 뒤영벌 특이병원체(후보) 3종, 즉 SBPV (Slow Bee Paralysis Virus), *Lysinibacillus fusiformis* (*L. fusiformis*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)에 대한 신속 검출법을 개발하고자 하였다. 이에 대한 특이 primer쌍을 새로이 선별 후 제작하여, 뒤영벌 수출입에 대한 검역에 활용할 수 있도록 실용화하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 실시간 PCR의 개발 이후, 다수의 새로운 실시간 PCR 방법이 지속적으로 신속하게 개발되었다. 실시간 PCR은 기존의 PCR 방법과 달리 실험자가 증폭 과정을 수행하고 동시에 원

하는 특정 유전자의 결과를 확인할 수 있다는 점에서 새로운 발견이었다. 특히, 형광 염료를 사용하여 형광값의 변화는 DNA 증폭과 비례하여 프로그램 상에 나타난다. (Heid *et al*, 1996; Higuchi *et al*, 1993; Nazarenko *et al*, 1997).

최근에 개발된 초고속 실시간 정량 PCR은 GENECHECKER™ 장비를 사용하여 신속한 열 전달 및 장치의 빠른 열 변환을 기반으로 수행할 수 있는 PCR이다. 50 회전의 전체 PCR 시간은 실시간 PCR 모니터링 기술을 도입할뿐만 아니라 약 15 분으로 PCR 시간이 단축될 수 있다. 또한, 기존의 PCR과는 달리 특수 얇은 플라스틱 칩 (Rapi-Chip™)의 챔버에 용액을 주입하고 전체 표면을 넓히면 용액에 대한 열전달 효율이 극대화된다. Rapi-Chip에 주입할 수 있는 PCR 용액의 최대량은 10 µl 이다. 또한, 칩의 바닥면은 변형되지 않고 오염되지 않도록 얇은 박막 재료로 구성되어 있다.

개발된 초고속 실시간 정량 PCR은 실시간으로 결과를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 샘플에 대한 정량화를 가능하게 한다. 개발된 rapid PCR 시스템은 다수의 병원균에 대한 현장에서 정량 측정을 수행할 수 있는 새로운 분자 검출 방법에 적용될 수 있다.

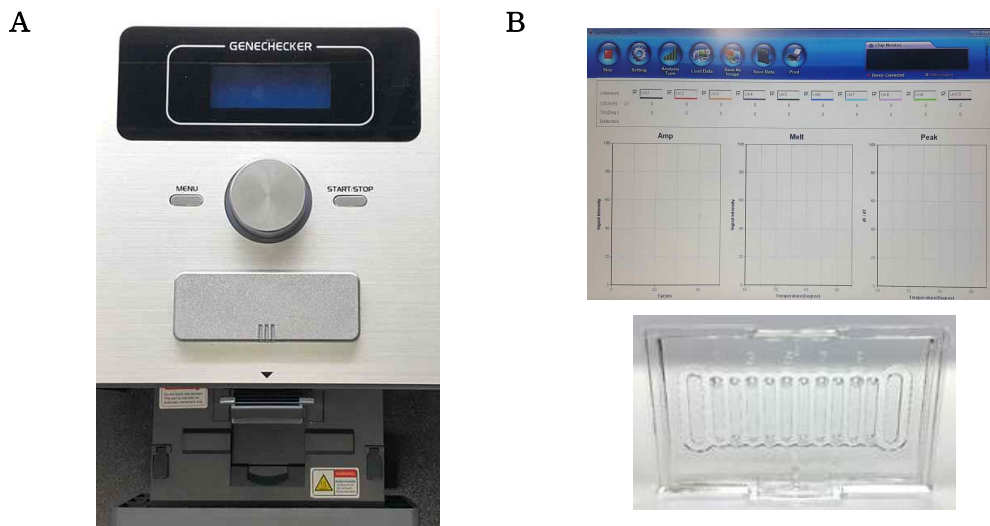


Figure 1. PCR system for Ultra-rapid real-time quantitative PCR

Panel A is rapid PCR machine for Ultra-rapid real-time quantitative PCR (Genechecker™). It is small in size and easy to move. Panel B is a system that can confirm fluorescence graph and melting curve analysis result with PCR reaction. The Rapi-Chip is composed of 10 wells and can perform multiple PCR reactions at once.

나. 시료의 확보 및 DNA와 RNA의 분리

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 수원, 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원, 벨기에에서 확보된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)을 사용하였다.

Genomic DNA (gDNA)의 분리는 Qiagen사의 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)의 시행방법을 따랐다. 먼저, 뒤영벌 시료 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합 후, MagNaLyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 180µl buffer ATL를 넣어주었다. 20µl proteinase K를 추가로 넣어 완전히 혼합한 후, 56°C에서 조직이 완전히 용해될 때까지 혼합해주며 정치하였다. 조직이 용해가 완료되면 15초간 혼합해준 뒤, 200µl의 buffer AL을 시료에 넣어주고 혼합해주었다. 200µl의 ethanol (96-100%)을 추가한 뒤, 다시 혼합해주었다. 앞서 혼합한 혼합물을 전용 column에 모두 loading하였다. 이를 8,000rpm에서 1분간 원심분리 한 후, collection tube에 나온 용액을 제거하였고, column에 500µl의 AW1를 넣고, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 세척하였다. 이후 column을 새로운 2.0ml collection tube로 옮기고, buffer AW2를 500µl 넣어주었다. 그러고난 뒤, 14,000rpm에서 3분간 원심분리해 column의 membrane을 완벽하게 건조시켰다. 그 후, collection tube를 제거하고 새로운 1.5ml 원심분리 tube로 column을 옮겨준다. 200µl의 AE buffer를 DNeasy membrane에 넣어준 다음 1분간 상온에서 정치한 후, 8,000rpm에서 1분간 원심분리하여 genomic DNA 200µl를 용출해낸다. 추출된 total gDNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70°C에 보관하며 이후 뒤영벌 병원체 검출 실험에 사용하였다.

Total RNA 분리는 R&A Blue Kit (Takara, Japan)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 방법을 서술하면, 뒤영벌 시료 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합한 후 1.0ml R&A Blue 시약을 넣고 MagNaLyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 200µl chloroform을 넣고 15초간 vortexing 하여 혼합하였으며, 4°C에서 13,000 rpm 10비드가 들어있는 tube에 시료를 넣어주고 1ml RNA iso plus를 넣고 MagNa Lyser(6000rpm, 60sec)를 이용해 3번 분쇄하였다. 이후, 5분간 RT (25°C-37°C) 정치 후, 13,000rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리가 완료된 혼합물에서 상층액만을 뽑아 원심분리용 tube에 옮긴 후, 200µl chloroform 넣고 invert mixing을 10회 진행하였다. 혼합이 완료된 용액은 5분간 상온에서 정치 후, 13,000rpm으로 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리가 완료된 용액에서 상층액만을 다시 원심분리용 tube에 옮

겨 동량의 isopropanol을 넣어 invert mixing을 10회 진행하였다. 이후, 10분간 상온에서 정지한 후, 13000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 모두 제거해준 뒤, 상층액과 동량의 75% EtOH 첨가 후 혼합하였다. 그런 다음, 10,000rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리한 후, 상층액 모두 제거하고 RNA pellet 완벽하게 건조하였다. 건조가 완료된 RNA pellet에 50µl RNase free water를 분주하고 혼합하여주었다. 추출된 total RNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70°C에 보관하며 이후 뒤영벌의 RNA virus 검출 실험에 사용하였다.

다. 뒤영벌 특이 primer들의 제작 및 재조합 plasmid DNA 확보

뒤영벌 병원체 13종에 대하여 GenBank (NCBI)에서 염기서열 정보를 확인한 후 각각 한 쌍의 특이 primer들을 설계 하였고, 해당 PCR 산물의 길이는 정량 초고속 PCR에 적합하도록 110bp부터 250bp 범위 내에서 설계하였다.

뒤영벌 병원체 주요 13종의 재조합 DNA는 경기대학교 생명과학과 분자생물학 연구실에서 확보된 것을 사용하였다. ABPV의 특이 재조합 DNA는 GenBank AF150629.1 (ABPV full genome)의 5529-5717 염기 (길이: 189 염기)를 탑재하고 있으며, pAB189라 명명하였다. BQCV의 특이 재조합 DNA는 GenBank KP119603.1 (BQCV full genome isolate JL1)의 7658-8358 염기 (길이: 701 염기)를 탑재하고 있으며, pBQ701이라 명명하였다. CBPV의 특이 재조합 DNA는 GenBank EU122229.1 (CBPV full genome isolate A-79P)의 1921-2490 염기 (길이: 570 염기)를 탑재하고 있으며, pCB570이라 명명하였다. DWV의 특이 재조합 DNA는 GenBank JX878305.1 (DWV full genome Korea-2)의 8756-9616 염기 (길이: 861 염기)를 탑재하고 있으며, pDW861으로 명명하였다. IAPV의 특이 재조합 DNA는 GenBank KC690270.1 (IAPV full genome)의 5283-6186 염기 (길이: 905 염기)를 탑재하고 있으며, pIA905으로 명명하였다. KBV의 특이 재조합 DNA는 GenBank AY275710 (KBV full genome)의 5406-5848 염기 (길이: 443 염기)를 탑재하고 있으며, pKB443으로 명명하였다. SBV의 특이 재조합 DNA는 GenBank AF092924 (SBV full genome)의 6363-7159 염기 (길이: 824 염기)를 탑재하고 있으며, pSB824로 명명하였다. kSBV의 특이 재조합 DNA는 GenBank HQ322114 (kSBV full genome)의 823-1330 염기 (길이: 528 염기)를 탑재하고 있으며, pkSB528으로 명명하였다. 진균류인 *P. larvae*의 특이 재조합 DNA는 GenBank U85263 (*P. larvae* full genome)의 1-797 염기 (길이: 797 염기)를 탑재하고 있으며, pPL797으로 명명하였다. *M. plutonius*의 특이 재조합 DNA는 GenBank X75751 (*M. plutonius* full

genome)의 355-918 염기 (길이: 564 염기)를 탑재하고 있으며, pMP564으로 명명하였다.

뒤영벌 의심병원체인 *L. fusiformis* 특이 재조합 DNA는 pLF159라 명명하였고, 이는 GenBank CP010820.1 (*L. fusiformis* full genome)의 4568067-4568195염기(길이: 159 염기)를 탑재하고 있다. 또한, *K. oxytoca*는 ATCC 1686을 입수하여 배양하였고, genomic DNA를 추출하여 diol dehydratasereactivating factor 유전자의 부분을 PCR 증폭하여 clone화하였다. 제작된 *K. oxytoca* 특이 재조합 DNA는 pKO208이라 명명하였고, 이는 GenBank AF017781의 2,065-2,272염기(길이: 208 염기) 탑재하고 있다(민 등., 2017).

한편, Slow bee paralysis virus (SBPV)의 경우, GenBank EU035616의 염기서열을 기준으로 330 특이 염기서열들을 설계하였으며, 이 염기서열의 제작에 필요한 long-nucleotide들은 전문회사(Bionics, Korea)에 의뢰하여 공급받았고, 혼합 신장 및 각 말단 primer에 의한 PCR로 합성 제조하였다. 증폭된 330염기의 PCR산물은 클론화하여 표준기질로 사용하였으며, 제작된 SBPV 특이 재조합 DNA는 pSBP330이라 명명하였다. 이는 GenBank EU035616의 7,190-7,519염기(길이: 330 염기)를 탑재하고 있다(Table 1, Figure 2, Figure 3).

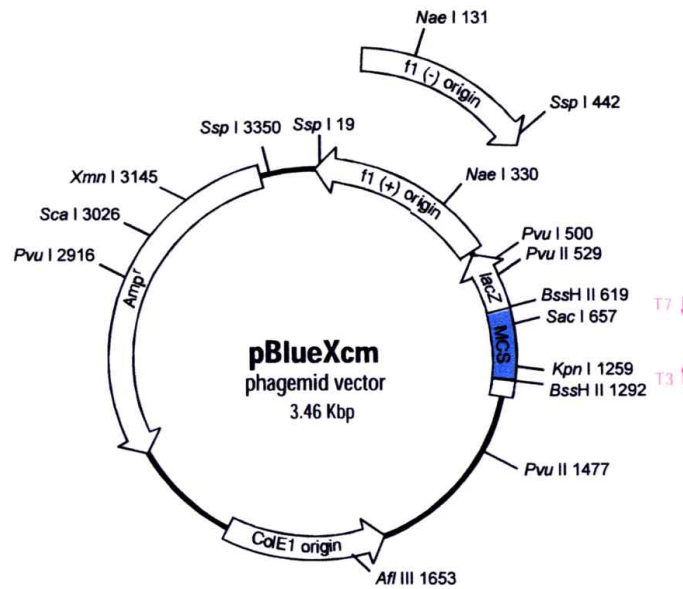


Figure 2. Genetic Map of pBlueXcm vector.

pBlueXcm originates to pBluescript II KS (+) (Stratagene, U.S.). Total vector size is 3.46kb and the vector has two restriction recognition site of Xcm I, restriction enzyme, in multiple cloning sites. Amp^r and lacZ represent ampicillin resistance gene and β-galactosidase subunit, respectively (Yoon *et al.*, 2014).

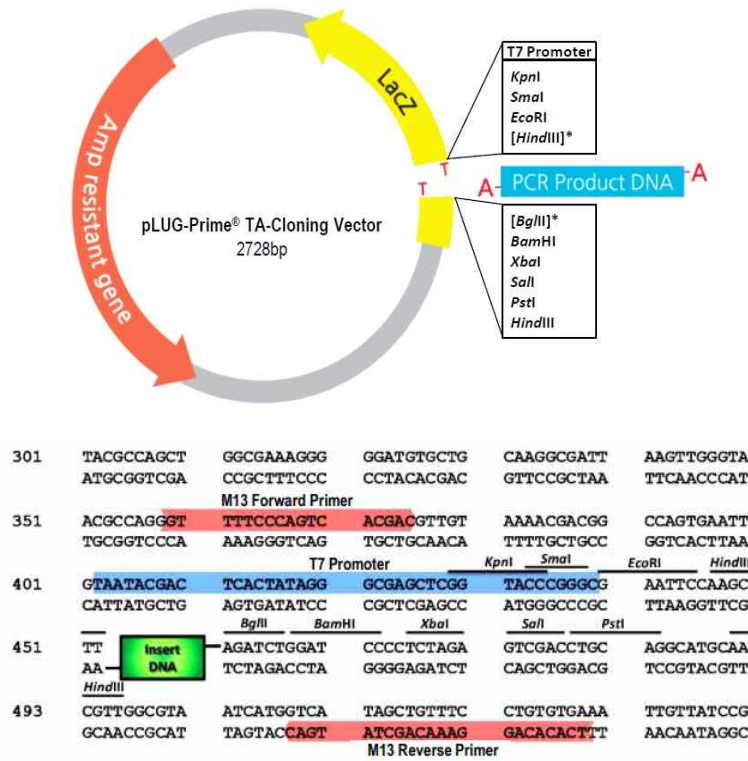


Figure 5. Genetic Map and Multiple cloning site sequence of the pLUG TA-cloning vector (iNtRON biotechnology, Korea)

Table 1. The recombinant DNAs of honey bee pathogens

Pathogen	Recombinant DNA	GenBank accession No.	Insert size	Reference
ABPV	pAB189	AF150629.1	189 (5529–5717)	This study
BQCV	pBQ701	KP119603.1	701 (7658–8358)	Giang <i>et al.</i> , 2016
CBPV	pCB570	EU122229.1	570 (1921–2490)	Choi <i>et al.</i> , 2008
DWV	pDW861	JX878305.1	861 (8756–9616)	Lee <i>et al.</i> , 2015
IAPV	pIA905	KC690270.1	905 (5283–6186)	Wang <i>et al.</i> , 2016
KBV	pKB443	AY275710	443 (5406–5848)	Yoo <i>et al.</i> , 2001
SBV	pSB824	AF092924	824 (6363–7159)	Kim <i>et al.</i> , 2008
kSBV	pkSB528	HQ322114	528 (823–1330)	Wang <i>et al.</i> , 2016
SBPV	pSBP330	EU035616	330 (7190–7519)	Min <i>et al.</i> , 2017
<i>P.larvae</i>	pPL797	U85263	797 (1–797)	Wang <i>et al.</i> , 2016
<i>M.plutonius</i>	pMP564	X75751	564 (355–918)	Ha <i>et al.</i> , 2005
<i>K.oxytoca</i>	pKO208	AF017781	208 (2,065–2,272)	Min <i>et al.</i> , 2017
<i>L.fusiformis</i>	pLF159	CP010820.1	159 (4568067–4568195)	Min <i>et al.</i> , 2017

각 검출용 primer들은 Table 1의 재조합 DNA를 토대로 설계하여 전문회사(Bionics, Korea)에 의뢰하여 제조하였다(Table 2).

Table 2. Specific primer sets for the detections of pathogens in *Bombus spp.*

No.	Name of primers	Sequence (5' → 3')	Size of amplified PCR product
ABPV	AB-n-F	CATTATGGAAAAATTTGCTGACC	114bp
	AB-n-R	CCACAAATGTGTGTTGAGTTA	
BQCV	BQ-RT-F	CTGGGCGAACATCTACCTTTCC	159bp
	BQ-RT-R	GCAATGGGTAAGAGAGGCTTCG	
CBPV	CB-PCR-F1	CCGACACATACTTCACTCTCTCAT	230bp
	CB-PCR-R1	GTACTIONGCGGCGAGGTTCTG	
DWV	DW-PCR-F1	ACTATAAGAATTTTGGTCCTGGGT	223bp
	DW-PCR-R1	ATGTCCGTTATCGGAGAACCTGA	
IAPV	KBIA-PCR-F1	ATTTTTCAACTTTTGATGGATCAC	214bp
	IA-PCR-R2	CAATTGAGCGGGGTCGTTGC	
KBV	KBIA-PCR-F1	ATTTTTCAACTTTTGATGGATCAC	214bp
	KB-PCR-R1	CAGTTAAGGGGTGTTGTTGC	
SBV	SB-PCR-F1	AGTGGGGATGAAATTACTIONAG	236bp
	SB-PCR-R1	CGCACATAAATGCCTCGGTAATA	
kSBV	kSB-PCR-F1	CTTACGCTAAGTGCGCGC	257bp
	kSB-PCR-R1	AGCACGATGATATCTAAAGGG	
SBPV	SBPV-F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224bp
	SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA	
<i>P.larvae</i>	AFB-PCR-F1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA	243bp
	AFB-PCR-R1	TCCTCTCCTACACTCAAGTCTCC	
<i>M.plutonius</i>	EFB-PCR-F1	AAGAGTAACTGTTTTCTCTCG	208bp
	EFB-PCR-R1	TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	
<i>K.oxytoca</i>	K.oxytoca-DC-F1	ATGAACGGTAATCACAGCGCC	145bp
	K.oxytoca-DC-R1	TGTCCACGACCTCTCCG	
<i>L.fusiformis</i>	L.fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGTATTTTTCAC	129bp
	L.fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCTTATC	

라. 뒤영벌 병원체 13종의 초고속 검출을 위한 초고속 역전사 반응

뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 검출에 있어서 병원체의 신속한 cDNA 합성은, PCR에 서의 목적 유전자 증폭을 좀 더 빠르게 시작할 수 있게 하며, 결과적으로는 전체 검사 소요 시간을 단축할 수 있게 하는 중요 요소이다. 따라서 PCR 검출 결과에 영향을 주지 않으며, 초고속 PCR에 적용 가능한 역전사 시간은 어느 정도 인지, 또한 시간에 따라 역전사 효율이 어떻게 변화하는지 확인하고자, 그 시간을 10분, 7분, 5분, 4분, 3분, 2분, 1분, 0.5분, 0분으로 50℃의 reverse transcription을 각기 수행하였으며, DWV 감염 시료(수원, 경기)로부터 추출

한 50ng의 total RNA를 주형으로 반응시켜 각 조건에서 C_T 를 비교 분석 하여 정량을 실시하고 C_T time 상호비교 하였다. 또한 RT incubation을 따로 수행하는 two-step RT-PCR과 RT incubation부터 PCR까지 한 번에 수행하는 one-step RT-PCR의 결과를 비교하여 두 방법에서의 검출 결과의 차이를 확인하고자 하였다.

URRTRT-PCR은 GENEHECKER (GENESYSTEM Co., Ltd, Korea)를 사용하여 수행하였으며, $2 \times$ RT Rapi mix와 50ng의 total RNA, specific forward/reverse primer, HC 표시자 ($0.2\text{pmole}/\mu\text{l}$)로 총 $10\mu\text{l}$ 를 조성하였다. 이외 초고속 PCR 반응은 95°C pre-denaturation 30초, 95°C denaturation 1초, 55°C annealing 3초, 72°C polymerization 1초로 50회전 수행하였다.

마. 질병 진단을 위한 최적 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립

진단에 적합한 꿀벌 애벌레의 핵산 사용량을 확립하기 위하여, 꿀벌 애벌레에서 추출한 핵산을 주형으로 β -actin 유전자의 증폭량을 확인하였다. PCR 반응은 $5\mu\text{l}$ 의 $2 \times$ Rapi mix와 $1\mu\text{l}$ 씩의 β -actin 151-F (최종 농도 1uM)와 β -actin 151-R (최종 농도 1uM) 프라이머에 꿀벌 애벌레의 핵산 (최고 $1\mu\text{g}$ 에서 최저 1ng 까지 희석)까지 총 $10\mu\text{l}$ 로 조성하여 수행했으며, 이때의 positive control로써 1.48×10^5 copies의 β -actin 유전자를 포함하는 재조합 DNA를 사용하여 β -actin PCR 산물의 합성 유무와 특이 T_m 값을 비교하였다. Multi-PCR 반응은 95°C 초기변성 15초, 95°C 변성 1초, 52°C 중합 2초, 72°C 신장 0초로, 총 50회전 수행하였다.

바. 뒤영벌 병원체 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

초고속 PCR의 최적화를 위하여 주형으로 각 병원체별 특이 재조합 DNA를 사용하였으며, OD260 (Optical Density 260nm)으로 정량한 후, 1.0×10^5 분자를 기준으로 초고속 PCR에 사용하였다. 초고속 PCR 기기는 GENEHECKER (Genesystem Co., Korea)를 사용하였으며, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 초기변성 95°C , 15초 후, 변성 95°C , 1초, 혼성 2초, 중합 72°C , 0초를 기준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다. 최적 annealing 온도는 $45^\circ\text{C} \sim 65^\circ\text{C}$ 의 범위에서 구하였으며, 최적 primer 농도는 $4\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $0.5\mu\text{M}$, $0.25\mu\text{M}$ 에서 각각 진행하였다. 이후, 초고속 PCR의 온도 및 시간 조건은 상기의 기준조건부터 최적 혼성온도와 시간을 C_T 값과 최대 형광값을 기준으로 재조정하였다.

사. 뒤영벌 병원체 특이 검출을 위한 각 특이 Primer 별 용점 분석 및 검출 한계의 측정

뒤영벌 병원체 각 13종에 대하여 각각 초고속 PCR 반응 후 증폭산물의 용점온도 분석을 실시하였다. 이 용점온도 분석도 60°C부터 90°C까지 1초 간격으로 1°C씩 증가하며 SyBr Green의 형광값을 측정하여 그래프로 나타내었고, 그래프를 미분화하여 온도변화의 최고점을 확인하여 용점분석을 진행하였다. 이 최고점은 T_m (Temperature of midpoint)와 같은 의미이며, 이들을 각각의 PCR 산물에 대한 T_m으로 제시하였다. 표준 기질에 대한 PCR 산물의 T_m값을 기준으로 비특이적 반응 산물을 구분할 수 있었다.

검출 한계 측정을 위하여, 뒤영벌 병원체 각 11종의 특이 유전자에 대한 재조합 plasmid DNA들을 spectrophotometer로 260nm의 흡광도에서 정밀 정량 측정하여, 각 DNA용액 중 표준기질 분자의 수를 계산하였다. 각 재조합 plasmid DNA는 1×10⁸ 분자부터 1×10⁰ 분자까지 10배씩 연속 희석하여 각 PCR에서 주형 DNA로 사용하였다. 연속 희석된 주형 DNA와 각 PCR에서 primer의 각 최종농도는 0.5μM이 되도록 하였으며, 2x fast RT-PCR premix (Nanohelix, Korea)를 사용하여 뒤영벌 병원체 특이 PCR의 검출한계를 측정하였다. 실시간 PCR의 반응액 조성 중 서양뒤영벌의 50ng gDNA를 추가하여 이하의 PCR 반응들을 수행하였다. Real-time PCR은 Genechecker™ (GeneSystem Co., Korea)을 사용하였으며, 조건은 95°C, 15초 pre-denaturation을 진행하였고, 95°C, 1초 denaturation, 54°C, 2초 annealing, 72°C, 0초 extension 의 조건으로 50 cycle 진행하였다.

아. 서양뒤영벌 검체에서 다중 실시간 PCR로 감염된 병원체 검출 및 판정

국내에 유통되고 있는 서양뒤영벌 시료의 병원체 감염여부를 판단하기 위하여, 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원에서 생산된 뒤영벌 각 1마리에 대하여 gDNA와 total RNA를 분리하였다. Total RNA 중 1μg을 one-step PCR을 통해 virus에 대한 검출을 시도하였고, gDNA는 50ng을 사용하여 뒤영벌 병원체 ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, SBPV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *K. oxytoca*, *L. fusiformis* 13종에 대하여 다중 실시간 초고속 PCR (multiple URRT-qPCR)을 수행하였다.

각 뒤영벌 병원체에 대하여 각 최적농도의 primer 쌍 (각 최종농도)이 사용되었으며, 총 10 μl volume으로 수행하였다. 다중 실시간 PCR은 Genechecker™ (Gene System Co., Korea)

를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C, 15초 pre-denaturation 후, 95°C, 1초 denaturation, 54°C, 2초 annealing, 72°C, 0초 extension의 조건으로 50 cycle을 진행하였으며, PCR 증폭산물의 용접분석은 60°C에서 90°C까지 수행하였다.

3. 결과

가. 뒤영벌 병원체 13종의 초고속 검출을 위한 초고속 역전사 반응

RNA-virus를 검출하는 RT-PCR에서, 유효한 RT과정, 즉 빠른 cDNA template의 생산은 전체 RT-PCR 시간을 최소화하기 위한 중요 과정이다.

먼저, 역전사 반응 (50 °C)의 시간을 순차적으로 감소시켜 각기 cDNA를 제작한 뒤, 동일 조건에서 따로 PCR 반응을 진행하는 two-step PCR을 실시하였으며, 목적 유전자의 C_T와 C_T-time을 측정하였다. 10분의 RT incubation 후 초고속 PCR에서 측정된 C_T는 평균 15.91 cycles (C_T time: 5분 27초, RT 시간 제외) 이었으며, 7분의 RT incubation에서 C_T는 17.70 cycles (C_T time: 6분), 5분에서 C_T는 18.1 cycles (C_T time: 6분 8초), 4분에서 C_T는 16.92 cycles (C_T time: 5분 46초), 3분에서 C_T는 17.93 cycles (C_T time: 6분 5초), 2분에서 C_T는 18.84 cycles (C_T time: 6분 22초), 1분에서 C_T는 19.24 cycles (C_T time: 6분 29초), 0.5분에서 C_T는 22.83 cycles (C_T time: 7분 36초), 0분에서 C_T는 29.64 cycles (C_T time: 9분 44초)으로, RT incubation을 주지 아니하고 바로 초고속 PCR을 시행한 것 (0분)에서도 target 유전자의 PCR 산물을 관찰할 수 있었다. 반면 RTase 없이 시행한 초고속 PCR은 PCR 산물을 관찰할 수 없었으며, C_T 값도 측정되지 않았다 (Figure. 3A).

목적 유전자를 주형으로 한 정량 초고속 PCR을 기반으로, 상기의 C_Ts 는 RT반응의 시간에 따른 각 cDNA의 수로 역산할 수 있었으며, 0분에서 1분 까지 RT incubation 시간에 따라 합성된 목적 유전자의 cDNA 분자 수가 급격하게 증가하는 양상을 보였으며 (4.03×10^6 molecules/min), 이는 816.75배/분에 해당하는 증가율이며, 이와 달리 1분 초과부터 10분까지의 RT incubation에서는 평균 1.20배/분의 비교적 완만한 증가를 보여주고 있다.

한편, 각기 초고속 PCR에 의하여 생성된 PCR-product들은 각기 해당 C_T에서 균일한 양에도달한다고 가정할 수 있으며, 각 초고속 PCR에서 측정된 C_T간의 차이, 즉 dC_T를 RT-incubation time (min)으로 나누어 정리한다면, dC_T(10분-7분)은 0.60 cycles/분 (17.70-1

5.91=1.79), $dC_T(7\text{분}-5\text{분})$ 은 0.20 cycles/min (18.10-17.70=0.4), $dC_T(5\text{분}-4\text{분})$ 은 1.18 cycles/min (16.92-18.10=-1.18), $dC_T(4\text{분}-3\text{분})$ 은 1.01 cycles/min (17.93-16.92=1.01), $dC_T(3\text{분}-2\text{분})$ 은 0.91 cycles/min (18.84-17.93=0.91), $dC_T(2\text{분}-1\text{분})$ 은 0.4 cycles/min (19.24-18.84=0.4), $dC_T(1\text{분}-0.5\text{분})$ 은 7.18 cycles/min (22.83-19.24=3.59), $dC_T(0.5\text{분}-0\text{분})$ 은 13.62 cycles/min (29.64-22.83=6.81)으로 계산되며, 이는 RT-incubation time (min)이 1분을 초과하여 길어질수록 분당 dC_T 는 감소하며 5분 이상에서는 dC_T 는 급격히 감소함을 보여주고 있다.

이는 상기의 cDNA수 (초기 주형 분자수)의 계산에서도 같은 결과를 보이고 있으며, 처음 0.5분의 RT-incubation time에서 생산된 cDNA수는 7.86×10^5 molecules/min (398-4.94=393.06), 이후 1분 (30초동안)까지 생산된 cDNA수는 7.26×10^6 molecules/min (40.3-3.98=36.32(0.5분))으로 증가세가 변화하였다.

한편, 초고속 PCR의 빠른 PCR을 검토하기 위하여, 측정된 C_T 에 이르기까지의 시간, 즉 C_T -time을 고려하면 약 4.0×10^6 molecules of initial template일 때 초고속 PCR에서 C_T -time은 6분 29초 ($C_T=19.24$ cycles)이었고, 각 초기 주형의 양을 생산할 수 있는 RT-incubation time을 포함한 초고속 PCR의 C_T -time은, 1분의 RT-time과 6분 29초의 C_T -time을 보인 RT-PCR이 시간적으로 가장 유리함을 볼 수 있다 (소요시간 7분 29초).

따라서, 다양한 RT-time을 가하여 cDNA를 제작한 후 초고속 PCR을 연결시킨 실험에서 1분의 RT incubation time은 검출하기에 충분한 양의 cDNA를 합성하였으며, total detection time, 즉 RT-time + C_T -time의 면에 가장 빠른 것으로 확인하였다.

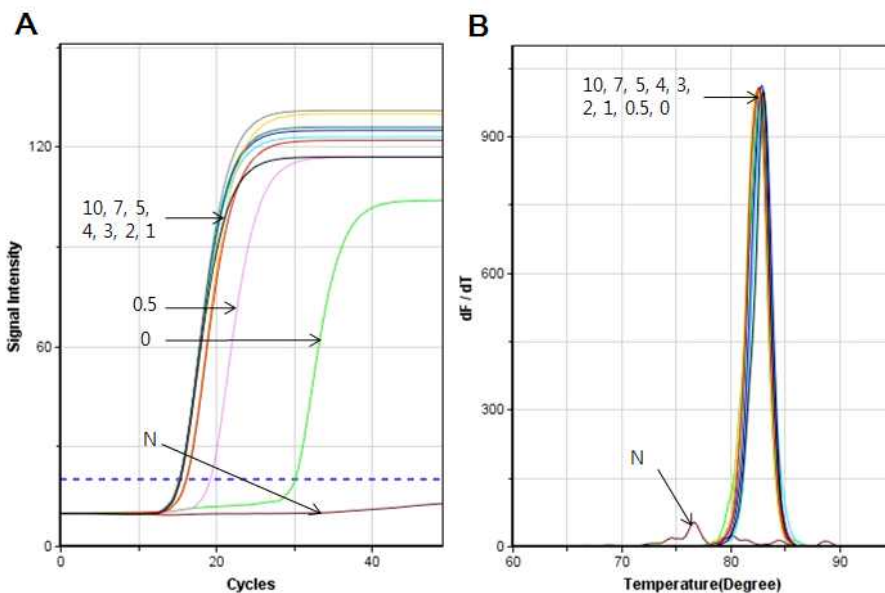
cDNA 제작을 위한 Reverse transcription 반응은 cDNA를 따로이 제작하여 PCR에 사용한 two-step RT-PCR과 역전사 반응 이후 곧바로 PCR 증폭을 진행하는 one-step RT-PCR로 나누어 실시하였으며, 두 조건에서 각 RT incubation time에 측정된 C_T 값과 C_T time을 각기 비교하였다.

C_T 증가 곡선에서 two-step RT-PCR의 경우, 0분에서 1분의 RT 반응 시간동안 0분에서 0.5분 사이에 dC_T 13.62 cycles/min (29.64-22.83=6.81), 0.5분에서 1분 사이에 7.18 cycles/min (22.83-19.24=3.59)의 급격한 반응이 확인되며, 1분 이후의 반응시간 동안은 C_T

값이 완만하게 유지되는 것을 확인하였으나, one-step RT-PCR의 경우, 0분에서 0.5분 사이에 dC_T 21.1 cycles/min ($32.74-22.19=10.55$), 0.5분에서 1분 사이에 2.08 cycles/min ($22.19-21.15=1.04$)로 30초 이후의 반응 시간 동안은 C_T 값이 완만하게 유지되었다 (Figure. 4A).

reverse transcription 시간을 포함한 RT time + C_T time 그래프 비교에서 two-step RT-PCR의 경우, 1분의 RT incubation에서 최단 검출 시간 (RT time + C_T time) 7분 29초로 검출이 가능함을 확인하였으며, one-step RT-PCR에서는 C_T 결과와 동일한 0.5분의 반응 시간 조건에서 최단 검출 시간 (RT time + C_T time) 8분 59초가 소요되었음을 알 수 있다 (Figure 4B).

위의 결과에서, 두 RT incubation 방법은 모두 0min부터 1min의 RT 시간동안 반응이 급격하게 증가함을 보였으며, C_T 변화량 역시 초기 1분에서 가장 강세를 보였다. 특이적으로, one-step RT-PCR에서는 0.5분까지의 C_T 변화량이 21.1cycles/min으로 가장 급격했으며, 가장 빠른 검출 시간 8분 59초를 보였다. One-step/two step RT reaction은 두 반응 간 실험 방법이 다소 상이하였지만, 목적하는 cDNA 합성과 PCR product의 증폭이 모두 동일한 패턴으로 1분 내에서 가장 효율적이었으며, 이는 검출 시간적인 면에서도 동일하였다 (단, 합성되는 특이 cDNA수가 검출 한계를 넘는 조건일 때).



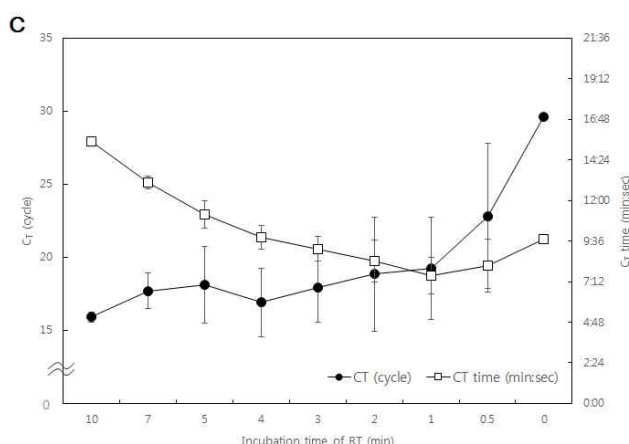


Figure. 3. C_Ts and C_T times of each amplification according to the incubation time of reverse transcription in two step RT-PCR

Under 1 minute RT incubation time, C_T was 19.24 cycles and the C_T time without RT incubation time was measured as 6min 29sec in two-step RT-PCR. One minute RT incubation shows 7 min 29sec of detection time and DWV specific cDNAs which was synthesized was 4.03×10^6 molecules.

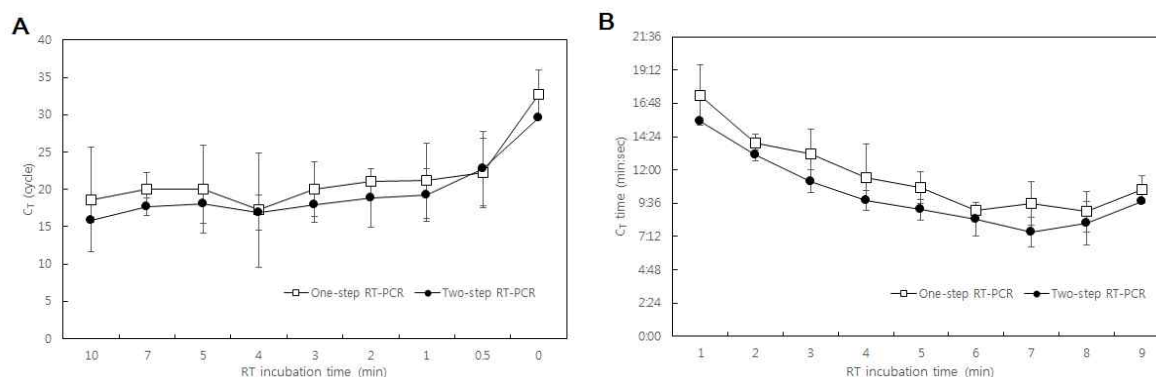


Figure. 4. Comparison of C_T and C_T time of One-step/two-step RT-PCR under each condition of RT incubation time.

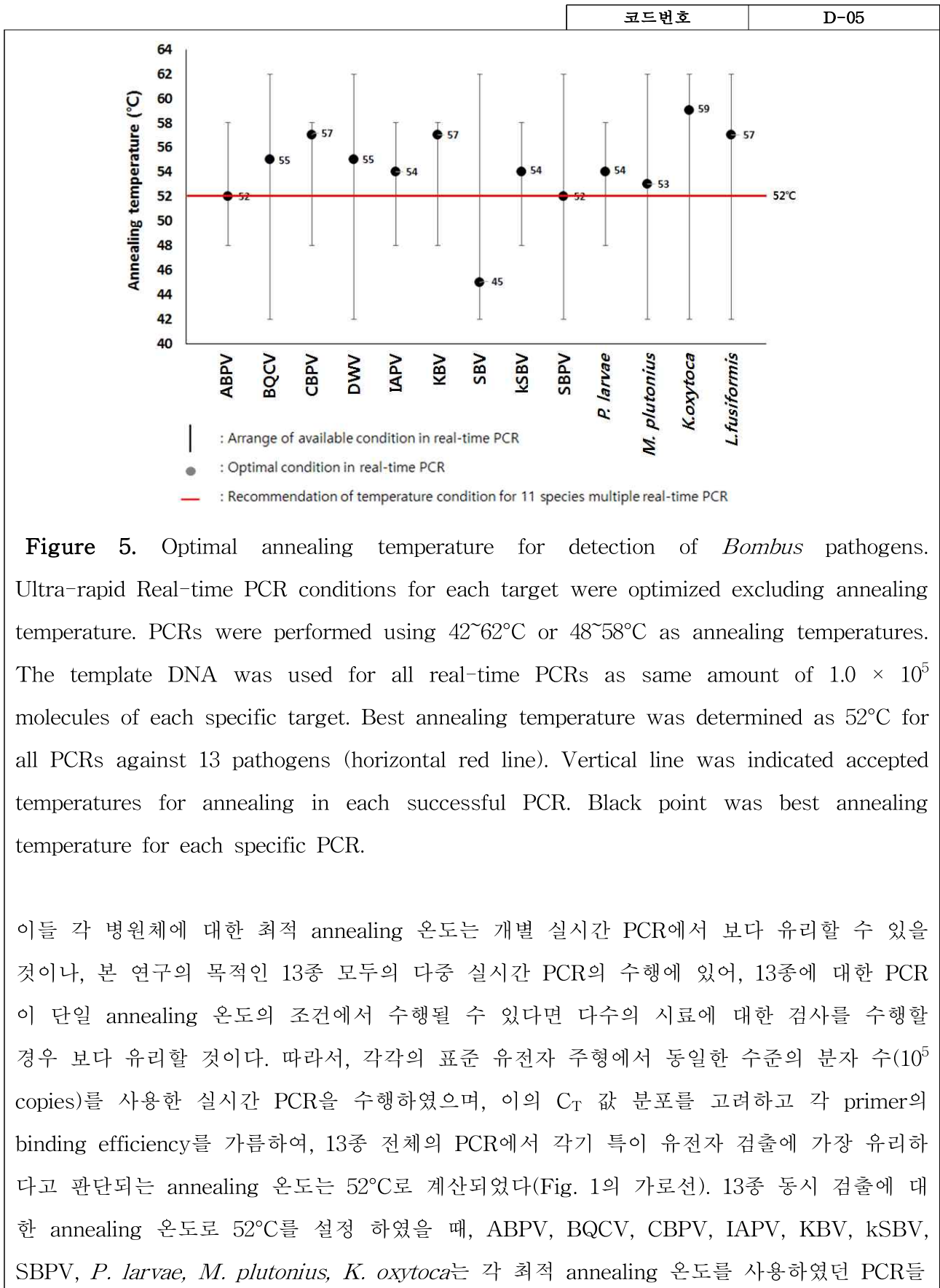
In two-step RT-PCR, C_T was 19.24 cycles and the detection time (RT time + C_T time) was measured as 7min 29sec under one minute RT incubation. In one-step RT-PCR, C_T was 22.19 cycles and the detection time (RT time + C_T time) was measured as 8min 59sec under 0.5 minute RT incubation. It can be seen that the cDNA synthesis is most abruptly performed from 0 minute to 1 minute of RT time in both PCR conditions.

나. 질병 진단을 위한 최적 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립

병원체 감염 시료의 초기 총 핵산을 최소화하는 것은 시료로부터 병원체 특이 유전자를 검출해 내는데 있어 불리하며 또한 과도한 핵산의 존재 역시 중합효소 연쇄반응에 영향을 주기 때문에 진단에 적합한 꿀벌 핵산의 범위를 정하는 것은 중요하다. UR-PCR에 적합한 꿀벌 핵산 사용 범위의 확립을 위해, genomic DNA (gDNA)는 꿀벌 애벌레 한 마리 (평균 73 mg)로부터 평균 1.59 μg 을 추출하였고, 추출한 핵산은 꿀벌의 housekeeping 유전자인 β -actin 유전자의 검출을 위해 각각 1000 ng, 500 ng, 250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 1 ng을 반응에 사용하였다. β -actin 유전자 증폭 형광 그래프 상에서 정규 곡선을 형성하며, 초기 형광 강도의 2배 이상의 최종 형광 값을 갖는 핵산 농도는 100 ng, 50 ng, 25 ng과 10 ng이었으며, 25 ng의 gDNA를 주형으로 하였을 때 가장 높은 최종 형광 값을, 1000 ng과 500 ng에서는 가장 낮은 형광 값을 나타내었다. 꿀벌 핵산 농도별 β -actin의 T_m 값은 앞선 실험의 81.79 ± 0.84 범위의 유의 값에 분포하였다. 또한 100 ng - 25 ng의 주형에서 C_T 값 24 cycles 로써 가장 빠르게 측정되었으며, 이어서 10 ng과 250 ng에서 C_T 값 25ng, 1000 ng과 500 ng에서는 C_T 값이 측정되지 않았다. 이는 과량의 핵산 (1000 ng과 500 ng)을 사용할 경우 목적 유전자의 증폭 유무를 판단하기에 부적합함을 보여 주었다. 따라서 과량의 핵산에 의한 영향이 없으며, 병원체 유전자를 포함하는 최대의 핵산을 사용하기 위하여, 형광그래프 상에서 관측되는 정규 곡선, 최종 형광 값, 그리고 측정된 C_T 값을 토대로, PCR 증폭에 최적인 꿀벌 핵산 사용량은 50 ng으로 판정하였다.

다. 뒤영벌 병원체 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

뒤영벌의 13종 병원체 검출을 위한 primer쌍들을 사용한 최적 PCR 조건들을 확립하고자, 각각의 primer 쌍을 사용한 PCR에서 최적 annealing 온도를 구하였다. 실시간 PCR들의 결과에서, BQCV, DWV, SBV, SBPV, *M. plutonius*, *L. fusiformis*와 *K. oxytoca*의 경우는 각 특이 유전자가 42~62°C annealing 온도범위에서 최고량의 PCR 증폭산물을 만드는 것이 관찰되었으며, ABPV, CBPV, IAPV, KBV, kSBV와 *P. larvae*들은 48~58°C annealing 온도에서 특이 PCR 증폭이 유효한 것으로 나타났다. 또한, 최적의 annealing 온도 조건은 각기 45°C (SBV), 52°C (ABPV, SBPV), 53°C (*M. plutonius*), 54°C (IAPV, kSBV, *P. larvae*), 55°C (BQCV, DWV), 57°C (CBPV, KBV, *L. fusiformis*), 59°C (*K. oxytoca*)로 다양하게 측정되었으나, 하나의 조건에서 13종 병원체 검출을 위한 PCR의 annealing 온도는 52°C로 통합하였다. 각 annealing 온도의 허용범위와 함께 각 최적 온도는 세로선과 점으로 나타내었다(Figure. 5).



과 유사한 결과를 보였으나, DWV, *L. fusiformis*는 각 PCR annealing 온도와 각 3.8°C, 2.8°C의 차이를 보이고, 또한 SBV의 경우는 8.2°C의 차이를 보인 만큼 최적 온도조건에서 벗어난 PCR 결과를 보였다. 이들의 경우 Ct 값에서 평균 1.06 cycles의 손실을 보였으나, 각 PCR 산물은 충분한 수준의 DNA 증폭이 나타나 이후의 분석에서 큰 불리함이 발견되지 아니하였다(자료미제시).

초고속 PCR에 적합한 13종 질병 (13종의 유전자) 특이 프라이머의 최적 농도를 확립하기 위하여 최종 농도 4 μ M, 2 μ M, 1 μ M, 500 nM과 250 nM의 범위에서 UR-PCR반응을 진행하였다. 3회 반복 시행하여 각 농도별 측정되는 C_T 값과 최종 형광 값, melting graph에서 비특이적인 그래프가 형성되지 않는 조건에서 최적 프라이머 농도를 설정하고자 하였다.

그 결과 BQ-RT-F/R, CB-PCR-F1/R1, DW-PCR-F1/R1, SBPV-F/ SBPV-C3G peptidase R, SB-PCR-F1/R1, kSB-PCR-F1/R1, AFB-PCR-F1/R1, EFB-PCR-F1/R1은 최종 농도 2 μ M을 사용하였을 때 민감도가 가장 우수하였으며, AB-n-F/R과 *L.fusi* detection F2/R2는 최종 농도 4 μ M을 사용하는 것이 검출에 가장 유리하였고 또한 KBIA-PCR-F2/IA-PCR-R2, KBIA-PCR-F2/KB-PCR-R1, *K.oxytoca*-DC-F1/R1는 최종 농도 1 μ M에서도 우수한 증폭을 보였다.

라. 뒤영벌 병원체 특이 검출을 위한 각 특이 Primer 별 용점 분석 및 검출 한계의 측정

11종 뒤영벌 병원체 각각의 특이 유전자에 대하여 실시간 PCR에서 각 primer 쌍의 민감도를 측정하였다. 각 특이 재조합 DNA는 10배씩 연속 희석시켜 실시간 초고속 PCR을 수행하였으며, 다중 PCR을 위한, annealing 최적 온도 52°C를 사용하여 실시되었다. 특이 유전자 증폭 확인을 위하여 용점 온도 분석을 실시하였으며, 각각의 T_m에 따라 특이 유전자 증폭과 비 특이적 유전자 증폭을 구분 할 수 있었다. 검출 한계 측정에서 낮은 수준의 특이 분자 수(10⁰~10² 분자)에 대한 유전자 증폭은 형광그래프에서 모두 증가하는 모양을 보였으나, T_m 값 분석을 수행하여 비 특이적 반응 산물을 구분하고 검출 한계를 판단하였다. 뒤영벌로부터 각각의 병원체에 대한 특이 primer 쌍에 의한 증폭산물의 정성적 판단은 T_m값 분석에서 쉽게 비 특이적 반응 산물을 구별할 수 있었다.

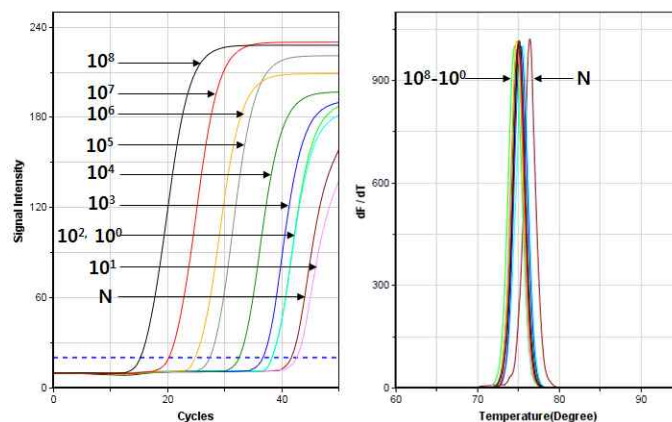
BQCV의 경우 비 특이적 증폭산물이 낮은 수준의 특이 분자 수(10⁰ 분자)의 증폭 PCR에서 관찰되었으며, BQCV 특이 증폭산물의 T_m은 77.18°C이고, 비 특이적 증폭산물의 T_m은

73.61°C로 상호 3.49°C의 차이가 있어 쉽게 구별할 수 있었다. CBPV의 경우 비 특이적 증폭산물이 낮은 수준의 특이 분자 수(10^0 분자)의 증폭 PCR에서 관찰되었으며, CBPV 특이 증폭산물의 T_m 은 85.97°C이고, 비 특이적 증폭산물의 T_m 은 76.53°C로 상호 9.44°C의 차이가 있어 쉽게 구별할 수 있었다.

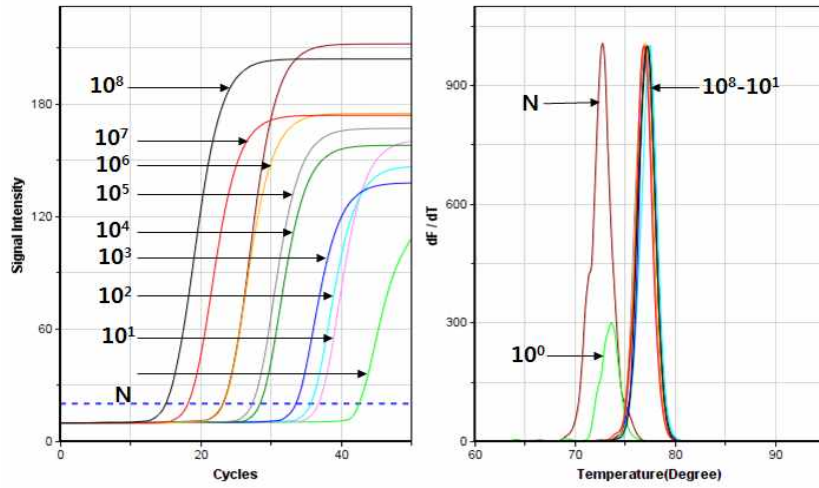
ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, SBPV, *P. larvae*, *M. plutonius*, *K. oxytoca*, *L. fusiformis*도 각기 같은 방법으로 특이 유전자 증폭산물의 T_m 값의 측정하였으며, 각 병원체에 대한 T_m 의 평균은 각각 75.02°C, 77.10°C, 87.91°C, 81.98°C, 80.73°C, 86.79°C, 83.26°C, 76.09°C, 81.82°C, 88.86°C, 86.24°C, 89.05°C, 78.80°C로 계산되었다. 이 과정에서 발견된 대표적 비 특이적 증폭산물도 T_m 값을 측정하였으며, 특이 증폭산물의 T_m 값과 함께 병기하였다.

본 연구인 뒤영벌 병원체 검출을 위한 다중 PCR 검출법은, 실험실적 표준 검사법으로 민감도를 측정하였으며, 이를 약술하면, 뒤영벌 시료의 total DNA와 total RNA를 추출하고, DNA 병원체에 대하여는 그대로 DNA 시료를 사용하며, RNA 병원체(RNA viruses)에 대하여 cDNA를 만들어 각기 13종의 PCR들을 동시에 진행하는 것이다. 결과로써 SBV의 경우 1.0×10^0 의 분자까지 특이 검출 가능하였고(Figure. 6H), ABPV, BQCV, kSBV, SBPV, *M. plutonius*, *L. fusiformis*의 경우 1.0×10^1 의 분자까지 특이적으로 검출할 수 있었으며(Figure. 6A, 6B, 6G, 6I, 6K, 6M), CBPV, DWV, KBV, *K. oxytoca*의 특이 증폭에서는 1.0×10^2 의 민감도를 보였고(Figure. 6C, 6D, 6F, 6L), IAPV, *P. larvae*에서는 1.0×10^3 의 민감도를 보여 주었으며(Figure. 6E, 6J), 이는 각각의 병원체에 대한 특이 유전자 증폭 검출 한계를 의미한다(Table 3).

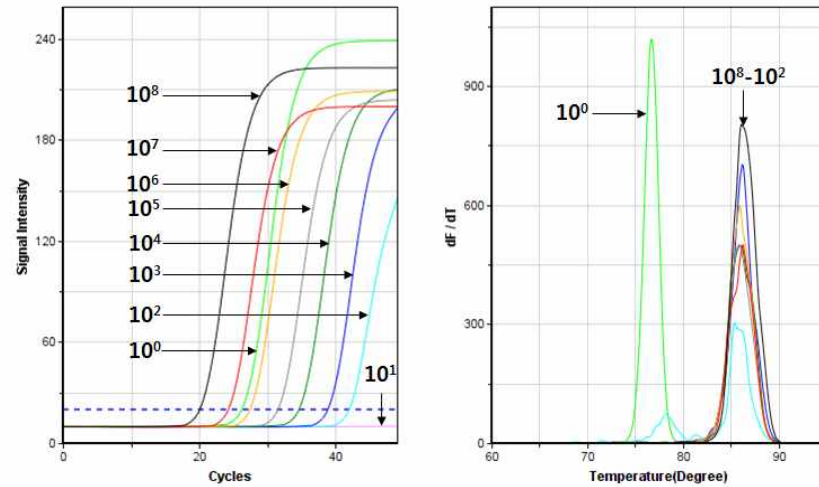
A



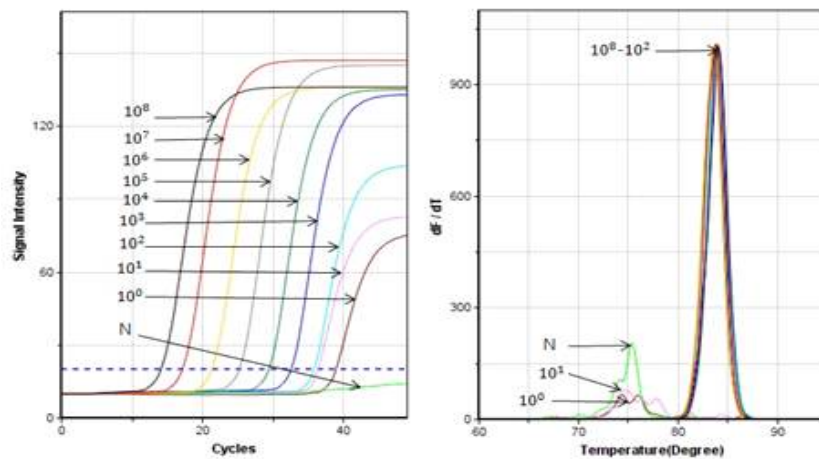
B



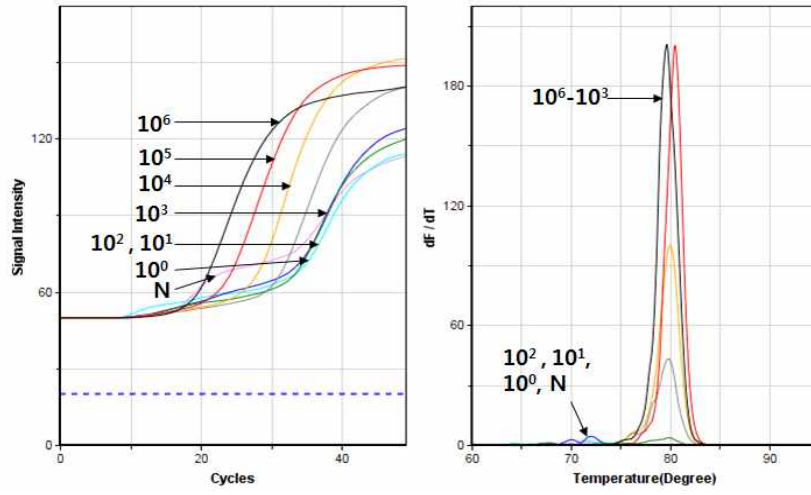
C



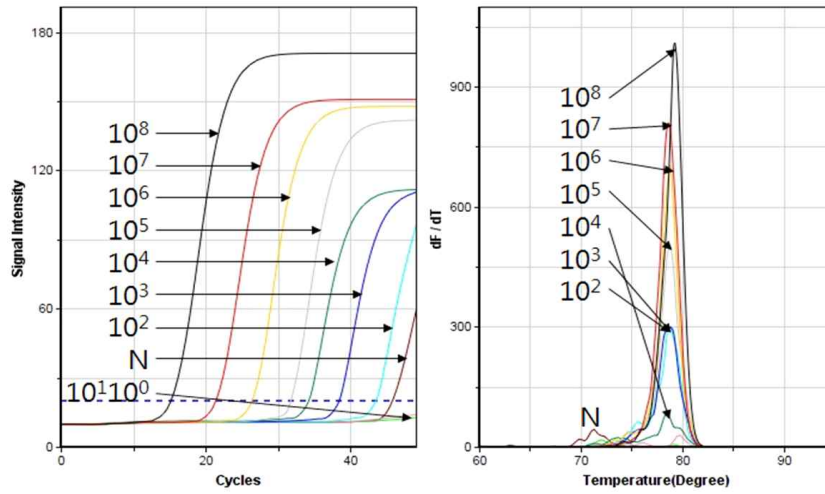
D



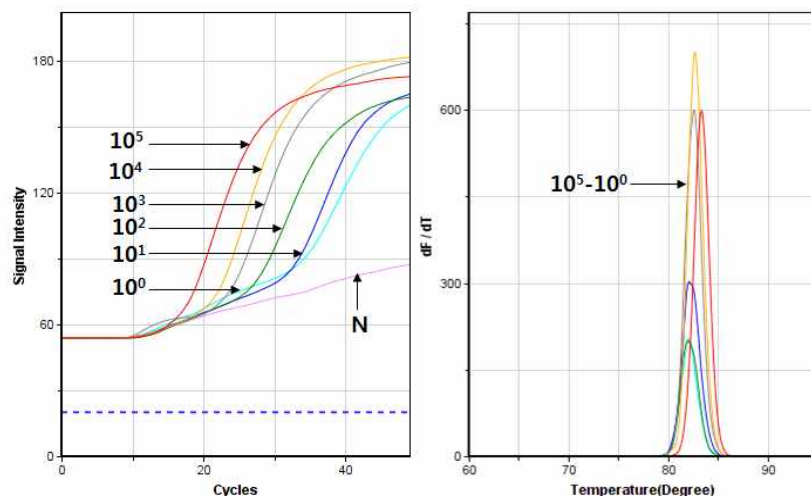
E



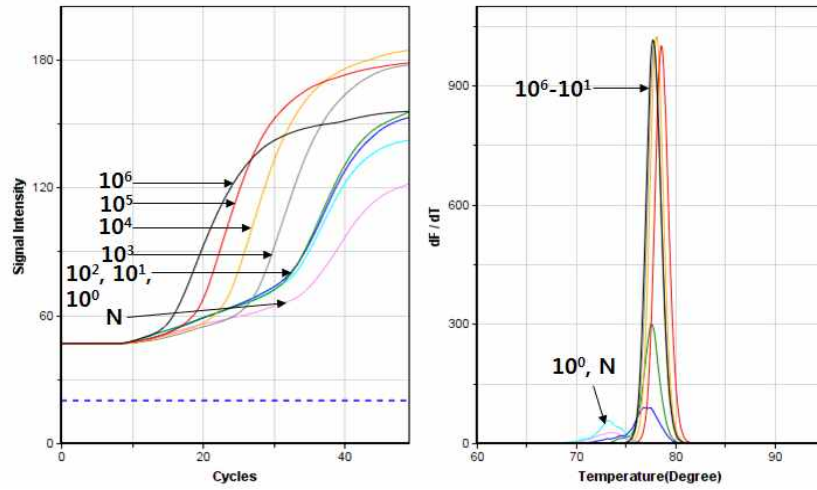
F



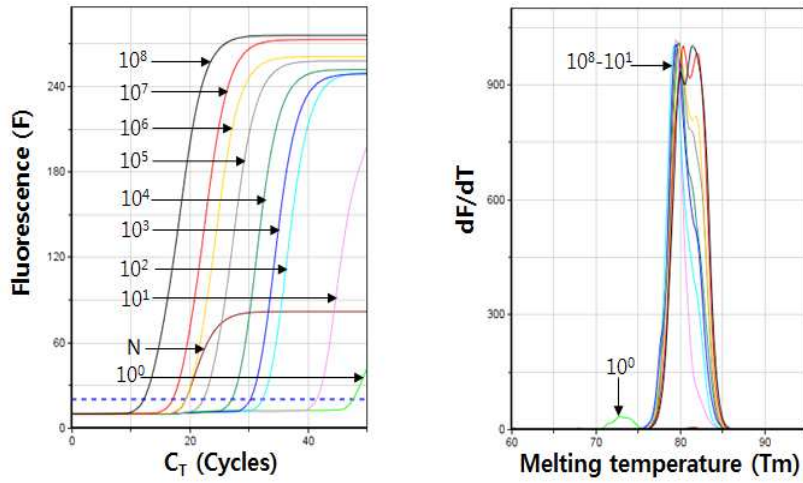
G



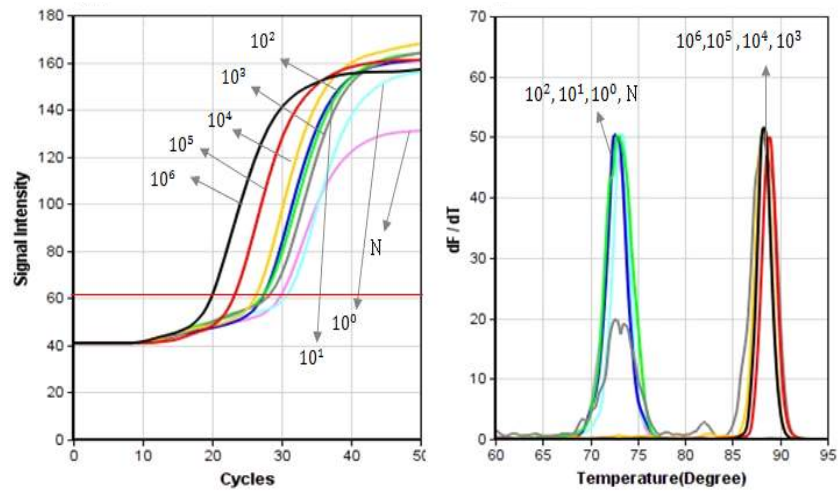
H



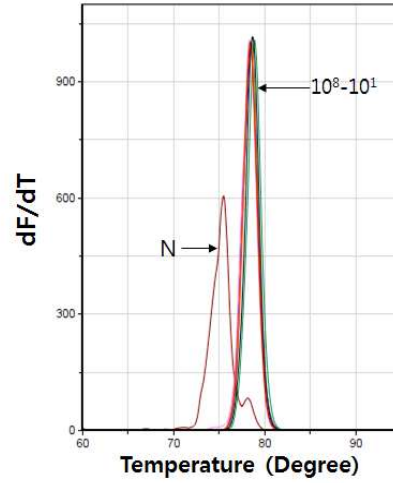
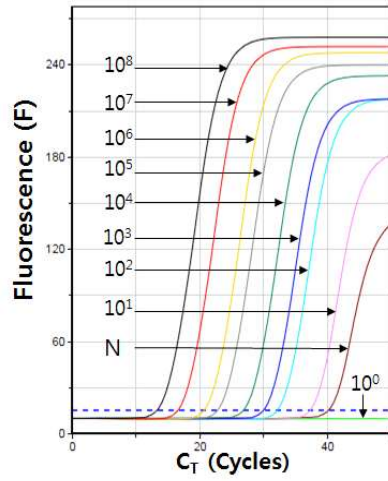
I



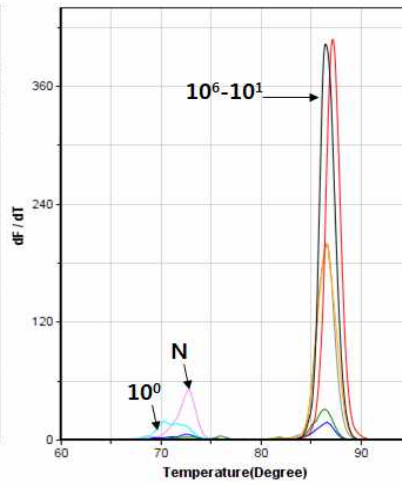
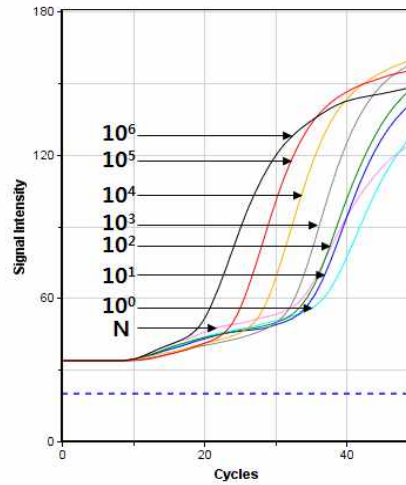
J



M



K



L

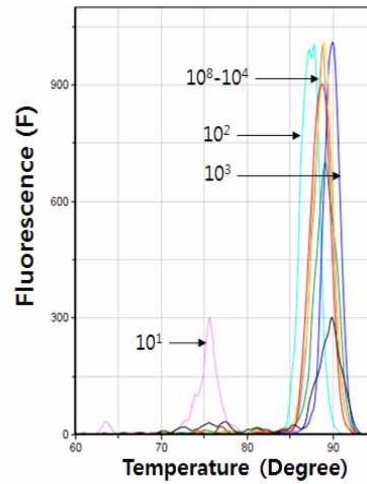
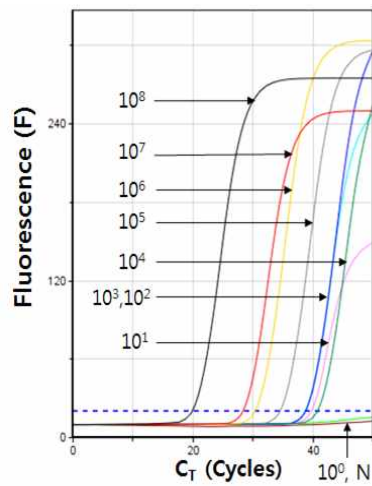


Figure 6. 13 species Bombus Pathogen-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis

(A) ABPV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (B) BQCV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (C) CBPV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (D) DWV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (E) IAPV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (F) KBV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (G) SBV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (H) kSBV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (I) SBPV-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (J) *P. larvae*-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (K) *M. plutonius*-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (L) *K. oxytoca*-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis. (M) *L. fusiformis*-specific detection using multiplex URRT-qPCR and its Tm analysis.

Table 3. Tm values for the amplicons of specific targets and Detection limit of each Bombus spp. Pathogens.

Pathogens	Melting temperature of specific amplicon(°C)	Detection limit (molecules)
ABPV	75.02±0.54	1.0 × 10 ¹
BQCV	77.10±0.25	1.0 × 10 ¹
CBPV	85.93±0.65	1.0 × 10 ²
DWV	81.98±0.34	1.0 × 10 ²
IAPV	80.73±0.34	1.0 × 10 ³
KBV	86.79±0.27	1.0 × 10 ²
SBV	83.26±0.43	1.0 × 10 ⁰
kSBV	76.09±0.34	1.0 × 10 ¹
SBPV	81.82±0.29	1.0 × 10 ¹
<i>P. larvae</i>	88.86±0.50	1.0 × 10 ³
<i>M. plutonius</i>	86.24±0.41	1.0 × 10 ¹
<i>K. oxytoca</i>	89.05±0.56	1.0 × 10 ²
<i>L. fusiformis</i>	78.80±0.33	1.0 × 10 ¹

마. 서양뒤영벌 검체에서 다중 실시간 PCR로 감염된 병원체 검출 및 판정

국내에 유통되고 있는 서양 뒤영벌에서 뒤영벌 병원체의 존재여부를 밝히기 위하여, 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원, 벨기에에서 생산된 뒤영벌을 검출용 시료로 사용하였으며, 보통 뒤영벌 성체 1마리로부터 gDNA와 total RNA를 각기 분리하여 검사하였다. 뒤영벌 병원체 특이 실시간 PCR은 동일 시료에서 분리된 RNA에서 One-step PCR을 이용하여 13종 병원체의 초고속 PCR을 동시에 수행하는 것으로써, 병원체 특이 증폭산물을 확인하여 그 존재 여부를 판정하였다.

먼저, 전라도 보성산 서양 뒤영벌에 대한 검사에서, BQCV-specific PCR은 BQCV-특이 산물을 형성하였고, 79.2°C의 정확한 T_m값을 보여주어 BQCV 양성(+)으로 판정되었으나, 70.0°C, 86.5°C의 T_m값을 가진 판정과는 무관한 작은 비 특이증폭도 나타났다. 이 BQCV-특이 증폭은 전기영동에서도 계산된 크기인 233bp와 일치하는 것으로 나타나 전기영동과 무관하게 다중 실시간 PCR에 의한 판정이 가능함을 보여주었다(자료 미제시). *L. fusiformis* 특이 PCR에서 특이 산물을 형성하였으며, 보성 시료에서 79.1°C의 T_m을 보여주어 양성(+)으로 판정하였다. 또한 CBPV, SBV, kSBV의 PCR에서도 증폭산물은 관찰되었으나, 각각의 표준 산물의 T_m값과 다른 결과가 나와 비 특이증폭으로 판단되었다. 또한 *K. oxytoca* 특이 PCR에서도 증폭산물은 관찰되었으나, 각각 표준과 다른 T_m값을 보이고, 용점곡선이 다수의 비 특이증폭임을 나타내어, 쉽게 음성으로 판정할 수 있었다. *P. larvae* 증폭산물의 경우 Ct 그래프의 증폭 곡선도 약하게나마 확인이 되었고, T_m값도 88.5°C로 측정되어 *P. larvae* 특이 증폭으로 보이나, 극히 소량의 *P. larvae* 특이 DNA가 존재하였다 판단하고, 음성(-*)으로 판정하였다.

또한, 경기도 광주의 서양뒤영벌에서는, BQCV, SBV, SBPV, *P. larvae*에 대하여 각기 DNA 증폭을 보여주었고, 각 용점분석에서 SBV 증폭산물은 83.0°C의 T_m값을 나타내어 양성(+)으로 판단되었으며, BQCV 증폭산물은 72.5, 80.5, 84.5°C의 T_m값을 보여 specific 유전자가 있는 것으로 판단되나, 확정검사가 요구되기에 양성 의심(+/-)으로 판정하였고, SBPV 증폭산물의 경우 81.5°C의 T_m값을 나타내는 PCR산물이 관찰되었으나, 확정 검사가 요구되기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다(자료 미제시).

경상남도 밀양의 서양 뒤영벌에서는, SBV, SBPV의 증폭산물이 관찰되었으며, SBV 증폭산물 용점분석에서 83.5°C의 T_m값이 계산되어 양성(+)으로 판정하였으며, SBPV 증폭산물은

81.5°C의 T_m값을 나타내는 PCR 증폭산물이 관찰되었으나, 확정 검사가 요구되기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다(자료 미제시).

경상북도 청송의 서양뒤영벌에서는 SBV 증폭산물이 84.0°C의 T_m값을 나타내고, 이 또한 확정 실험을 요구하기에, 양성 의심(+/-)으로 판정하였다. 경상남도 창원 의 서양 뒤영벌에서는 양성 의견을 보이는 병원체가 발견되지 아니하였다(자료 미제시).

국내 5개소에서 생산된 뒤영벌들에 대한 11종의 병원체 유전자 검색은 각각의 병원체 특이 유전자의 PCR 산물의 Ct값과 T_m값 그리고 전기영동에 의한 재 확인과정을 통하여 판정하였으며, 모든 자료가 너무 방대하여 정리된 결과를 제시하지 아니하였다(자료미제시).

한편, SBPV 증폭산물들은 광주, 밀양, 보성의 시료에서, 형광값이 크게 증가되는 것으로 관찰되었고, 각 증폭산물들에 대한 T_m 분석에서 각기 80.5°C 또는 81.5°C로 측정되었으며, 전기영동의 결과 예상 SBPV 증폭산물의 크기인 224 bp의 DNA 산물들이 약하게 관찰되었다(자료 미제시). 국내에 SBPV 존재는 아직 보고된 바 없으며, 본 연구를 위해 Oligonucleotide를 이용하여 DNA를 합성 후 재조합 DNA를 사용하였기에 본 연구의 후속 연구로써 보완되어야 할 것이다.

본 연구는 그간 주목을 받지 못하였던 서양 뒤영벌의 병원체들을 쉽게 모니터링하고 적절히 제어하기 위하여 해당 병원체들을 빠르고 쉽게 검출할 수 있도록 고안된 것이다. 서양 뒤영벌의 병원체들에 대한 관심은 이 화분매개 곤충의 수출입에 대한 관심과 함께 증대되고 있으며, 국내외로 미흡하였던 수출입 검역 검사의 요구에 부응하는 것이라 할 것이다. 본 연구에서 제안하는 뒤영벌 병원체 특이 다중 실시간 PCR (*Bombus pathogens specific multiple real-time PCR*)법이 질병 제어 및 검역현장에서 널리 사용되기를 기대한다.

4. 결론

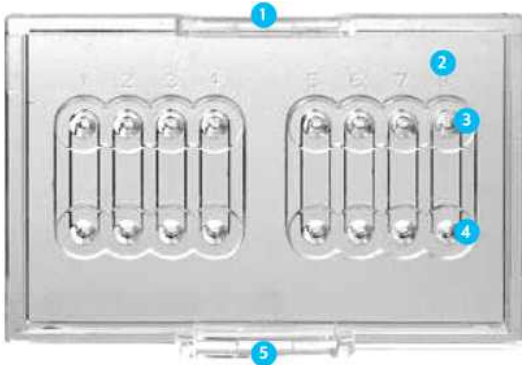
ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, SBPV, *Paenibacillus larvae*, *Mellisococcus plutonius*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca*의 뒤영벌 병원체들에 대한 다중 실시간 중합효소 연쇄반응법(PCR)을 개발하였다. 하나의 시료에서 추출된 핵산은 13종 PCR들에 같은 시간 및 조건으로 사용될 수 있으며, 각 병원체 특이 표적 DNA가 PCR 기질로 1000 분자가 존재한다면, 해당 특이 PCR 증폭산물들은 정성적, 정량적으로 20분 안

에 성공적으로 증폭되었다. 우리가 제안하는 이 다중 PCR 검출법이 뒤영벌의 국제교역을 위한 검역 검사에 사용되기를 기대한다.

5. PCR-chip의 제품화

가. 뒤영벌 주요 병원체 13종 검출용 PCR chip kit 구성품

(1) PCR chip (3개)



①, ⑤ Wings (날개) : 이 부분은 손가락이나 족집게를 통해 쉽게 조작할 수 있도록 제작되었습니다.

② Printed channel Numbers (표시된 channel 번호) : 조성시 쉬운 식별을 위해 칩의 윗면에 channel 별로 번호를 부여하여 인쇄되어 있습니다.

③ Apertures (조리개) : 조성한 샘플과 시약을 쉽게 분주할 수 있도록 pipette tip의 크기와 구멍을 맞춰 제작하였습니다.

Specification (설계설명서)

Size (W x D x H)	38mm x 25mm x 6mm
Weight	3.56 g
Number of Wells	10 wells for Model UF-150 and 16 wells for Model UF-100
Volume of Each Well	10 μ l
Aperture Diameter	Φ 0.6 mm
Channel Height	0.5 mm
Channel Height	8 mm
Channel Height	2 mm
Material	Transparent Polymer (Transparency : 95% +)

(2) 초고속 PCR을 위한 Master Mixes



- 초고속 PCR을 위한 GENECHECKER™ 와의 초고속 반응에 최적화
- 고감도, 고효율, 생산성이 높은 PCR을 가능하게하며 PCR 억제를 최소화
- 선택적으로 일반 열 전달, 실시간 분석 및 one-step RT-PCR을 가능하게함.

(3) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR의 Positive control인 재조합 DNA 시약 list

시약 No.	Recombinant DNA	GenBank accession No.	Insert size	Reference
시약 1	pAB189	AF150629.1	189 (5529-5717)	This study
시약 2	pBQ701	KP119603.1	701 (7658-8358)	Giang <i>et al.</i> , 2016
시약 3	pCB570	EU122229.1	570 (1921-2490)	Choi <i>et al.</i> , 2008
시약 4	pDW861	JX878305.1	861 (8756-9616)	Lee <i>et al.</i> , 2015
시약 5	pIA905	KC690270.1	905 (5283-6186)	Wang <i>et al.</i> , 2016
시약 6	pKB443	AY275710	443 (5406-5848)	Yoo <i>et al.</i> , 2001
시약 7	pSB824	AF092924	824 (6363-7159)	Kim <i>et al.</i> , 2008
시약 8	pkSB528	HQ322114	528 (823-1330)	Wang <i>et al.</i> , 2016
시약 9	pSBP330	EU035616	330 (7190-7519)	Min <i>et al.</i> , 2017
시약 10	pPL797	U85263	797 (1-797)	Wang <i>et al.</i> , 2016
시약 11	pMP564	X75751	564 (355-918)	Ha <i>et al.</i> , 2005
시약 12	pKO208	AF017781	208 (2,065-2,272)	Min <i>et al.</i> , 2017
시약 13	CP010820.1	CP010820.1	159 (4568067-4568195)	Min <i>et al.</i> , 2017

각 재조합 DNA에 대해서는 spectrophotometer로 정량하였으며, -70°C에 보관하며 모든 재조합 DNA를 1.0×10^8 분자로 희석하여 사용합니다. 이후 뒤영벌 병원체 13종에 대한 Positive control으로써 뒤영벌 병원체 검출 실험에 사용합니다.

(4) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR의 각 특이 Primer 시약 list

No.	Name of primers	Sequence (5' → 3')	Size of amplified PCR product
시약 14	AB-n-F	CATTATGGAAAAATTTGCTGACC	114bp
시약 15	AB-n-R	CCACAAATGTGTGTTGAGTTA	
시약 16	BQ-RT-F	CTGGGCGAACATCTACCTTTCC	159bp
시약 17	BQ-RT-R	GCAATGGGTAAGAGAGGCTTCG	
시약 18	CB-PCR-F1	CCGACACATACTTCACTCTCTCAT	230bp
시약 19	CB-PCR-R1	GTAATTGCGGCGAGGTTCTG	
시약 20	DW-PCR-F1	ACTATAAGAATTTTGGTCCTGGGT	223bp
시약 21	DW-PCR-R1	ATGTCCGTTATCGGAGAACCTGA	
시약 22	KBIA-PCR-F1	ATTTTCAACTTTTGATGGATCAC	214bp
시약 23	IA-PCR-R2	CAATTGAGCGGGTTCGTTGC	
시약 24	KBIA-PCR-F1	ATTTTCAACTTTTGATGGATCAC	214bp
시약 25	KB-PCR-R1	CAGTTAAGGGGTGTTGTTGC	
시약 26	SB-PCR-F1	AGTGGGGATGAAATTACTAG	236bp
시약 27	SB-PCR-R1	CGCACATAATGCCTCGGTAATA	
시약 28	kSB-PCR-F1	CTTACGCTAAGTGC GCGC	257bp
시약 29	kSB-PCR-R1	AGCACGATGATATCTAAAGGG	
시약 30	SBPV-F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224bp
시약 31	SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA	
시약 32	AFB-PCR-F1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA	243bp
시약 33	AFB-PCR-R1	TCCTCTCCTACACTCAAGTCTCC	
시약 34	EFB-PCR-F1	AAGAGTAACTGTTTTCCTCG	208bp
시약 35	EFB-PCR-R1	TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	
시약 36	K.oxytoca-DC-F1	ATGAACGGTAATCACAGCGCC	145bp
시약 37	K.oxytoca-DC-R1	TGTCCACGACCTCTCCG	
시약 38	L.fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGTATTTTCAC	129bp
시약 39	L.fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCCTTATC	

나. 뒤영벌 주요 병원체 13종 검출용 PCR chip kit 사용방법

(1) 감염의심 뒤영벌에서의 Total RNA와 Total DNA 분리

Genomic DNA (gDNA)의 분리는 Qiagen사의 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany)의 시행방법을 따릅니다(뒤영벌 주요 병원체 13종 검출용 PCR chip kit 내에 포함 되어있지 않음.).

- ① 뒤영벌 시료 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합 후, MagNaLyser (Roche, Switzerland)로 분쇄합니다.
- ② 분쇄된 시료에 180 μ l buffer ATL를 넣어줍니다. 20 μ l proteinase K를 추가로 넣어 완전히 혼합한 후, 56 $^{\circ}$ C에서 조직이 완전히 용해될 때까지 혼합해주며 정치합니다.
- ③ 조직이 용해가 완료되면 15초간 혼합해준 뒤, 200 μ l의 buffer AL을 시료에 넣어주고 혼합해줍니다.
- ④ 200 μ l의 ethanol (96-100%)을 추가한 뒤, 다시 혼합해줍니다.
- ⑤ 앞서 혼합한 혼합물을 전용 column에 모두 loading합니다.
- ⑥ 이를 8,000rpm에서 1분간 원심분리 한 후, collection tube에 나온 용액을 제거하였고, column에 500 μ l의 AW1를 넣고, 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 세척합니다.
- ⑦ 이후 column을 새로운 2.0ml collection tube로 옮기고, buffer AW2를 500 μ l 넣어줍니다.
- ⑧ 그러고난 뒤, 14,000rpm에서 3분간 원심분리해 column의 membrane을 완벽하게 건조시킵니다.
- ⑨ 그 후, collection tube를 제거하고 새로운 1.5ml 원심분리 tube로 column을 옮겨줍니다.
- ⑩ 200 μ l의 AE buffer를 DNeasy membrane에 넣어준 다음 1분간 상온에서 정치한 후, 8,000rpm에서 1분간 원심분리하여 genomic DNA 200 μ l를 용출해냅니다.
- ⑪ 추출된 total gDNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70 $^{\circ}$ C에 보관하며 이후 뒤영벌 병원체 검출 실험에 사용합니다.

Total RNA 분리는 R&A Blue Kit (Takara, Japan)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였습니다(뒤영벌 주요 병원체 13종 검출용 PCR chip kit내에 포함되어있지 않음).

- ① 뒤영벌 시료 1마리를 2.0ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합한 후 1.0ml R&A Blue 시약을 넣고 MagNaLyser (Roche, Switzerland)로 분쇄합니다.
- ② 분쇄된 시료에 200 μ l chloroform을 넣고 15초간 vortexing 하여 혼합하였으며, 4 $^{\circ}$ C에서 13,000 rpm 10비드가 들어있는 tube에 시료를 넣어주고 1ml RNA iso plus를 넣고 MagNaLyser(6000rpm, 60sec)를 이용해 3번 분쇄합니다.
- ③ 이후, 5분간 RT (25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C) 정치 후, 13,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심분리합니다.
- ④ 원심분리가 완료된 혼합물에서 상층액만을 뽑아 원심분리용 tube에 옮긴 후, 200 μ l chloroform 넣고 invert mixing을 10회 진행합니다.

- ⑤ 혼합이 완료된 용액은 5분간 상온에서 정치 후, 13,000rpm으로 4℃에서 15분간 원심분리합니다.
- ⑥ 원심분리가 완료된 용액에서 상층액을 다시 원심분리용 tube에 옮겨 동량의 isopropanol을 넣어 invert mixing을 10회 진행합니다.
- ⑦ 이후, 10분간 상온에서 정치한 후, 13000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리합니다. 상층액을 모두 제거해준 뒤, 상층액과 동량의 75% EtOH 첨가 후 혼합합니다.
- ⑧ 그런 다음, 10,000rpm으로 4℃에서 5분간 원심분리한 후, 상층액 모두 제거하고 RNA pellet 완벽하게 건조합니다.
- ⑨ 건조가 완료된 RNA pellet에 50 μ l RNase free water를 분주하고 혼합하여줍니다.
- ⑩ 추출된 total RNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70℃에 보관하며 이후 뒤영벌의 RNA virus 검출 실험에 사용합니다.

(2) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR의 Positive control인 재조합 DNA 추출법

iNtron사의 Fast DNA-spin™ Plasmid DNA Purification kit를 사용하여 뒤영벌 병원체 13종에 대한 재조합 DNA를 추출해냅니다(뒤영벌 주요 병원체 13종 검출용 PCR chip kit내에 포함되어있지 않음.).

- ① 1-4ml의 배양된 bacterial cell을 12,000 rpm (~13,400 xg)으로 microcentrifuge tube에 넣고 상온에서 1분간 원심분리하여 bacteria pellet을 모아줍니다.
- ② pellet화된 bacteria cell에 150 μ l의 M1 buffer로 pipetting 또는 vortexing을 통해 재부유시킵니다.
- ③ 재부유한 혼합물에 150 μ l의 M2 buffer를 첨가하고 6-8번 invert mixing을 통해 혼합해줍니다.
- ④ 그 후, 350 μ l의 M3 buffer를 첨가하고 즉시 12-20번 invert mixing을 통해 혼합해줍니다.
- ⑤ 혼합이 완료된 bacteria 혼합물은 상온에서 12,000 rpm (~13,400 xg)으로 2분간 원심분리해줍니다.
- ⑥ 원심분리를 통해 분리된 상층액을 spin column에 모두 옮겨줍니다.
- ⑦ 12,000 rpm으로 30초간 원심분리한 뒤, collection tube에 모인 용액을 모두 제거해줍니다.
- ⑧ Spin column에 300 μ l의 washing buffer를 넣어주어 12,000 rpm으로 30초간 상온에서 원

심분리한 뒤, collection tube에 모인 용액을 모두 제거합니다.

⑨ 잔여 washing buffer를 제거하기 위해 추가적으로 상온에서 12,000 rpm으로 1분간 원심 분리합니다.

⑩ 새로운 1.5 ml microcentrifuge tube에 spin column을 옮긴 후, 50-100 μ l Elution buffer를 membrane에 넣어주어 12,000 rpm으로 상온에서 30초간 원심분리하여 DNA를 추출해줍니다.

⑪ 추출된 plasmid DNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70°C 에 보관하며 이후 뒤영별 병원체 검출 실험에 사용합니다.

(3) 뒤영별 병원체 13종에 대한 초고속 PCR 조성

(가) 뒤영별 virus의 초고속 PCR 조성표

Components	Volume
Recombinant DNA ($1.0 \times 10^8 \sim 10^0$ molecules)	1 μ l
Sample (RNA 1 μ g)	
2x Master Mix	5 μ l
Forward Primer (4 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (4 μ M)	1 μ l
D.W.	Adjust to Final 10 μ l

(나) 뒤영별 진균의 초고속 PCR 조성표

Components	Volume
Recombinant DNA ($1.0 \times 10^8 \sim 10^0$ molecules)	1 μ l
Sample (gDNA 30-90ng)	
2x Master Mix	5 μ l
Forward Primer (2 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (2 μ M)	1 μ l
D.W.	Adjust to Final 10 μ l

(4) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR chip loading법

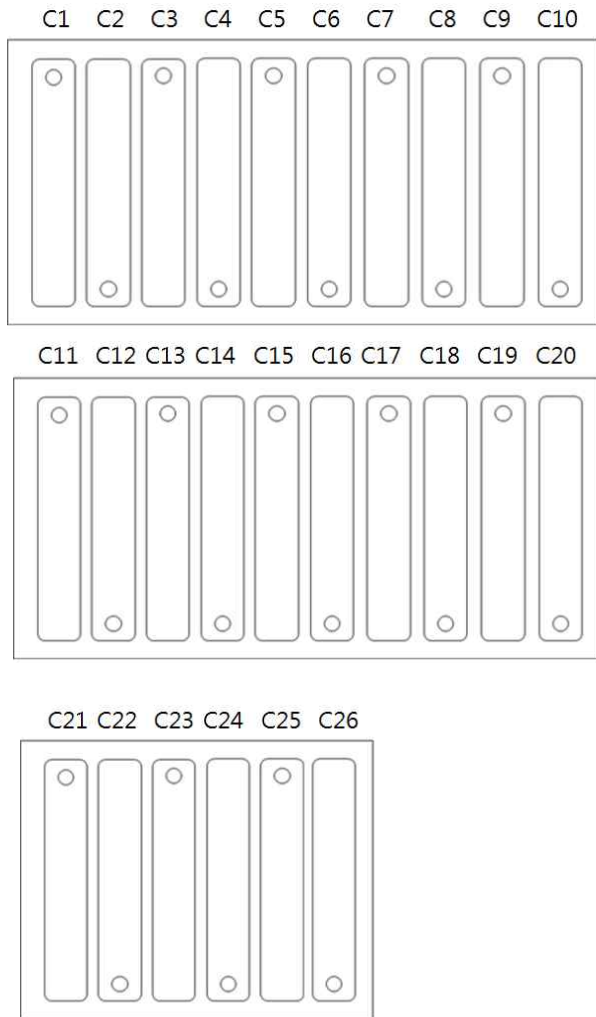
- ① 제안된 protocol에 따라 뒤영벌의 Sample을 준비하십시오.
- ② Micropipette을 사용하여 sample 혼합물을 준비하십시오. Sample 혼합물의 부피는 10 μ l입니다.
- ③ PCR chip의 흡입구에 pipette tip을 넣고 흡인된 sample 전체를 분배합니다.
- ④ 동봉된 밀봉 테이프를 사용하여 전체 channel을 밀봉하십시오. Channel 구멍을 완전히 밀봉하십시오. 완벽하게 밀봉하지 못할 경우, 증발을 통해 sample 손실이 우려됩니다.

(5) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR 최적 조건

genomic DNA용			RNA virus용	
One-step PCR			One-step RT-PCR	
Step	Condition	Cycles	Condition	Cycles
cDNA synthesis	Set at 0 sec	0	50 $^{\circ}$ C for 1 min	1
Pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C for 15 secs	1	95 $^{\circ}$ C for 15 secs	1
Denaturation	95 $^{\circ}$ C for 1 sec	50	95 $^{\circ}$ C for 1 sec	50
Annealing	52 $^{\circ}$ C for 2 sec	50	52 $^{\circ}$ C for 2 sec	50
Extension	72 $^{\circ}$ C for 0 sec	50	72 $^{\circ}$ C for 0 sec	50

뒤영벌 병원체인 *P. larvae*, *M. plutonius*, *K. oxytoca*, *L. fusiformis*에 대해서는 genomic DNA용 One-step PCR을 진행하고 뒤영벌 RNA virus인 ABPV, BQCV, CBPV, DWV, IAPV, KBV, SBV, kSBV, SBPV에 대해서는 RNA virus용 One-step RT-PCR을 진행합니다.

(6) 뒤영벌 병원체 13종에 대한 PCR chip 배치



- C1: ABPV positive control
- C2: ABPV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C3: BQCV positive control
- C4: BQCV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C5: CBPV positive control
- C6: CBPV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C7: DWV positive control
- C8: DWV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C9: IAPV positive control
- C10: IAPV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C11: KBV positive control
- C12: KBV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C13: SBV positive control
- C14: SBV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C15: kSBV positive control
- C16: kSBV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C17: SBPV positive control
- C18: SBPV 감염여부 확인을 위한 시료 조성
- C19: *P. larvae* positive control
- C20: *P. larvae* 감염여부 확인을 위한 시료
검출 조성
- C21: *M. plutonius* positive control
- C22: *M. plutonius* 감염여부 확인을 위한 시료 검
출 조성
- C23: *K. oxytoca* positive control
- C24: *K. oxytoca* 감염여부 확인을 위한 시료 검출
조성
- C25: *L. fusiformis* positive control
- C26: *L. fusiformis* 감염여부 확인을 위한 시료 검
출 조성

제 12 절 뒤영벌 병원체에 대한 다중 Oligonucleotide DNA-chip 개발 및 제품화

1. 서론

최근 농촌의 노동력 부족으로 인한 시설채소재배에 인공수분이 곤란함에 따라 화분매개 곤충에 대한 의존도가 높아지고 있다(Free, 1993). 화분매개 곤충으로서 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)의 연구는 세계 여러 나라에서 활발하게 이루어져있으며, 이미 상품화되어 보급되어지고 있다(de Ruijterm *et al* 1997; Dafni *et al*, 1998; Mashiro *et al*, 2000; Velthuis and Van Doorn, 2006). 우리나라도 서양뒤영벌은 약 2,300봉군이 1994년에 처음 국내에 수입되었으며, 2004년 약 30,000봉군 이상이 수입되었다(윤 등, 2008). 이후 뒤영벌의 국내 생산은 크게 증가하여, 2010년 이래 국내 뒤영벌 수요를 넘어서면서(민 등, 2017), 뒤영벌의 수출을 생각하고 있다(김 등, 2017).

서양뒤영벌에 대한 병원성 바이러스는 모두 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)에 대한 병원체로 처음 알려진 것들이며, 국내에서도 Black queen cell virus (BQCV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Cloudy wing virus (CWV), Deformed wing virus (DWV), Israeli acute paralysis virus (IAPV), Kashmir bee virus (KBV), Sacbrood virus (SBV)의 7종이 서양뒤영벌에서 검출된 바 있다(최 등, 2009; 최 등, 2010). 또한, *A. mellifera*와 *Bombus* species에서 각각 Deformed wing virus (DWV), Black queen cell virus (BQCV), Acute bee paralysis virus (ABPV), Slow bee paralysis virus (SBPV)들을 정량적으로 검출한 바 있었으며(Dino 등, 2015), 서양뒤영벌에서 *Lysinibacillus fusiformis*, *Klebsiella oxytoca*를 분리하고, 이들이 새로운 뒤영벌의 병원성 세균일 가능성을 제시하였다(김 등, 2008).

꿀벌 병원체 검색법의 경우, American foulbrood disease (AFB)의 원인균인 *Paenibacillus larvae* 그리고 주요 병원성 바이러스들, 즉 IAPV, CBPV, korean Sacbrood Virus (kSBV) 등에 대하여, 해당 병원체의 존재를 빠르게 확인하는 방법으로 초고속 실시간 PCR법을 개발되었으며 (유 등, 2009; 유 등, 2010; Han *et al.*, 2011), 꿀벌 주요 병원체의 종합적 검출을 위한 DNA-chip도 개발된 바 있으나(Wang *et al*, 2016), 뒤영벌을 검사대상으로 하여 다양한 병원체를 동시에 검사할 수 있는 검출법은 제시된 바 없었다. 또한 근래에 대두되고 있는 국내 뒤영벌의 수출 추진에서도, 뒤영벌의 검역기준은 국내외로 정립된 바가 매우 미약한 수

준이기에, 이를 명확하게 정립하기 위하여 뒤영벌 수출입을 위한 병원체 검사법, 또는 검역 기준은 매우 필요하다 할 것이다(민 등, 2017).

한편, 꿀벌 병원체에 대한 유전자 검사법은 주로 개별 병원체 진단을 목적으로 개발되어 왔으며, 이는 특이 유전자의 검출과 검량에 집중되어 왔다. 꿀벌 특정 병원체에 대한 일반 PCR 검출법 (Van Nguyen *et al.*, 2010; 유 등, 2007; 강 등, 2008), 병원체의 정량적 검출을 목적으로 하는 정량 PCR법 (유 등, 2008a; 유 등, 2008b; 유 등, 2010), 짧은 시간 내 병원체의 빠른 검출을 위한 초고속 PCR법 (Yoo *et al.*, 2011; Lim and Yoon, 2013; Luong *et al.*, 2015), 그리고 현장 적용성을 강화한 현장 초신속 검사법 (Ultra-fast PCR; UF-PCR)과 고리매개 등은 증폭법 (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)이 꿀벌 질병 진단법으로 개발되어 왔다(Lim, 2013; Lee *et al.*, 2016; 왕 등, 2016a). 하지만 이러한 검출법들은 개별 혹은 2개 병원체에 대한 PCR 검사와 진단에 초점이 맞추어져 있으며, 다양한 병원체에 대한 일련의 검색을 위하여 특이 PCR 검사들을 각각 수행 하여야 하는 불편함을 가지고 있다.

따라서 본 연구는 제 12 절에서 개발 및 제품화한 PCR chip과 함께 사용할 수 있는 병원체 11종의 주요 서양뒤영벌 병원체들에 대한 종합적 정성 및 정량 그리고 확정 검사를 위한 DNA chip을 개발하여 이를 바탕으로 제품화하고자 하였으며, 이를 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준으로 제시하고자 하였다. 검출대상 병원체들은 꿀벌 및 뒤영벌에서 교차 감염을 야기하는 8종의 병원체, 즉 BQCV, CBPV, DWV, IAPV, SBV, kSBV, *P. larvae*, *Mellisococcus plutonius*와 뒤영벌 특이 병원체(후보) 3종, 즉 SBPV, *L. fusiformis*, *K. oxytoca*를 선별하였으며, 이들에 대한 특이 primer쌍을 새로이 제작 또는 선별하여, 병원체 총 11종의 존재여부를 한 번의 시험으로 판정할 수 있는 초고속 유전자 검출법을 개발하여 제품화하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료의 확보 및 DNA의 분리

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 광주, 전라도 보성, 경상북도 청송, 경상남도 밀양, 경상남도 창원에서 확보된 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)를 사용하였다.

Genomic DNA (gDNA)의 분리는 G-spin™ Totla DNA Extraction Kit (iNtRON, Korea)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 DNA를 순수 분리하였다. 약술하자면, 뒤영벌 시료 1마리를

glass bead (pore size : 1 mm, Germany)가 담긴 2.0 ml tube에 담아 MagNa Lyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 300 μ l lysis buffer를 넣고 15초 vortexing 하여 혼합하였으며, 500 μ l binding buffer를 추가로 넣어 완전히 혼합한 후, 전용 column에 loading하였다. 이를 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 한 후, collection tube에 나온 용액을 제거하였고, column에 500 μ l의 washing buffer를 넣고, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 세척하였다. 이후 column을 1.5 ml 원심분리 tube로 옮기고, 60 μ l의 증류수를 column에 넣어 부착된 gDNA를 용출시키고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리로 DNA 용액을 수집하였다. 추출된 total gDNA를 spectrophotometer로 정량하였으며, -70 °C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

나. Total RNA의 분리 및 cDNA 합성

Total RNA 분리는 R&A Blue Kit (Takara, Japan)를 사용하여 제작자의 지시에 따라 수행하였다. 약술하면, 뒤영벌 시료 1마리를 2.0 ml tube에 넣고 glass bead (pore size : 1mm, Germany)와 혼합한 후 1.0 ml RNAiso plus (Takara, Japan) 시약을 넣고 MagNa Lyser (Roche, Switzerland)로 분쇄하였다. 분쇄된 시료에 200 μ l chloroform을 넣고 15초간 vortexing 하여 혼합하였으며, 4 °C에서 13,000 rpm 10분간 원심 분리하여, 상등액만을 1.5 ml tube에 옮겼다. 시료 상등액과 같은 부피의 isopropyl alcohol을 넣고 15초간 vortexing하여 혼합하였으며, 4 °C에서 13,000 rpm, 10분간 원심 분리하고 상등액을 제거하였다. RNA 침전물은 0°C로 준비한 75 % ethanol을 사용하여 washing 과정 진행한 후, DEPC 처리된 증류수를 사용하여 total RNA의 용액으로 확보하였다. 추출된 total RNA는 Biophotometer (Eppendorf Co, Germany)로 정량하였고 -70°C에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

cDNA를 합성하기 위해, total RNA의 3 μ g을 1 μ l 100 pmole Oligo dT (18mer) primer와 혼합한 후 D.W 6 μ l를 첨가하여 총 10 μ l이 되도록 하였다. 이 혼합물을 65°C에서 10분간 정치한 후, 즉시 ice로 옮겼다. 4 μ l 10 \times reverse transcription buffer, 2 μ l 100 mM Dithiothreitol (DTT), 3 μ l 2.5 mM dech dNTPs, 1 μ l M-MLV reverse transcription (200 U/ μ l)을 사용하여 총 20 μ l이 되도록 조성하였다. 이를 40°C에서 60분간 정시킨 후 95°C에서 5분간 반응시킴으로써 cDNA를 합성하였다. cDNA는 -20°C에서 보관하였으며, PCR 초기기 질로써 1 μ l씩 사용하였다.

Table 1. Primer sets for the specific detections of pathogens in *Bombus* species

Pathogens	Name of primers	Sequence (5' to 3')	PCR amplicon size (bp)
BQCV	BQ-DC-F1	ACTTTGAAGGTTTCGACGCTTCGG	233
	BQ-DC-R1	GACGGAATTTATAATAGCAGTGAGAT	
CBPV	CB-DC-F1	CCGACACATACTTCACTCTCTCAT	230
	CB-DC-R1	GTACTIONTGGCGGAGGTTCTG	
DWV	DW-DC-F1	ACTATAAGAATTTTGGTCCTGGGT	223
	DW-DC-R1	ATGTCCGTTATCGGAGAACCTGA	
IAPV	KBIA-DC-F1	ATTTTTCAACTTTTGATGGATCAC	213
	IA-DC-R2	AATTGAGCGGGTTCGTTGCA	
SBV	SB-DC-F1	AGTGGGGATGAAATTACTAG	236
	SB-DC-R1	CGCACATAATGCCTCGGTAATA	
kSBV*	kSBV-RPA F	CTTACGCTAAGTGC GCGCCAATACTAT AC	121
	kSBV-RPA R	GAAACAATAACTTTCCCGCACTGAAACT TA	
<i>P. larvae</i>	AFB-DC-F1	ATCGTAAAGCTCTGTTGCCAAGGA	243
	AFB-DC-R1	TCCTCTCTACTCAAGTCTCC	
<i>M. plutonius</i>	EF-DC-F1	AAGAGTAACTGTTTTCTCG	208
	EF-DC-R1	TCCTCTTCTGCACTCAAGTCTTC	
SBPV	SBPV-F	CGCAGGGTGATCATGCTAATG	224
	SBPV-C3G peptidase R	ACAGCAAACACCCGGACTAA	
<i>L. fusiformis</i>	L. fusi detection F2	CGTGACGCTGGTGTTATTTTCAC	129
	L. fusi detection R2	AGAACCACCTGGAATCTTATC	
<i>K. oxytoca</i>	Klebsiella-F	GAACGGTAATCACAGCGCC	208
	Klebsiella-R	CAGCATATGGCGGTCGC	
β -actin**	β -actin 151 F	ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG	151
	β -actin 151 R	GACCCACCAATCCATACGGA	

* Min *et al.*, 2016.

** Yang and Cox-Foster, 2005

다. 뒤영벌 특이 primer 및 재조합 plasmid DNA 확보

민 등(2017)의 뒤영벌 병원체 11종 검출법에 대한 primer 정보에서 GenBank의 염기서열 정보를 확인한 후 각 병원체에 대해 한 쌍의 특이적인 primer임을 확인하였고, 해당 PCR 산물의 길이는 정량 초고속 PCR에 적합하도록 120 bp부터 250 bp 사이가 되는 것 또한 확인하였다. 각 검출용 primer들은 전문회사(Bionics, Korea)에 의뢰하여 제조하였다(Table 1).

표준 DNA로 사용하기 위한 각 병원체들의 특이 클론은 경기대학교 생명과학과 유전학실험실에서 보관중인 것을 사용하였다.

라. Asymmetric 22 primer mix를 이용한 다중 PCR 최적 조건 확립

DNA chip에 적용하기 전, 초고속 PCR을 통해 초기기질을 생산하기 위해 뒤영벌 병원체 11종에 대한 각 특이 primer 쌍의 PCR 조건에서 annealing 온도를 확립하였다. PCR 반응은 Greenstar master mix (Bioneer, Korea)를 사용하여 총 20 μ l로 조상하여 수행하였다. 최적의 asymmetric 22 다중 PCR 조건은 22-Asy primer mix를 사용하여 pre-denaturation 94°C에서 5분을 진행한 후, 변성 94°C 30초, 혼성 52°C 30초, 신장 72°C 30초의 조건을 35회전 진행하였다. Asymmetric primer mix는 hybridization의 효율을 높이기 위해 1:4, 4:1 또는 1:2 (Forward primer : Reverse primer) 비율로 고안하였다. SBR (Spot/Background Ratio) 값에 기초하여 hybridization 효율 및 primer 비율을 분석하였다.

마. Oligonucleotide probes의 설계

Oligonucleotide probe는 각각의 특이 PCR 증폭산물의 내부서열을 사용했다. Probe는 특이적인 hybridization를 위해 전문회사인 Bionics Corporation (Bionics, Korea)에 의뢰하여 제작되었다. Probe는 K-CAP™ (K-MAC, Korea)에 의뢰하여 DNA chip에 합성하였고, 제작된 DNA chip은 본 연구를 통해 평가되어 재설계되었으며, 실험을 통해 새롭게 합성한 것을 사용하였다. DNA chip의 생산은 K-MAC과 K-SCNA-CAP 스캐너와 소프트웨어 프로그램 (K-MAC, Korea)을 사용하여 분석되었다.

바. DNA chip의 생산

DNA chip의 silicone plug를 사용하여 200 μl tube에 K-CAP™의 유리막대를 덮었다. DNA chip의 표면은 microarray의 면이 PCR 증폭산물에 맞닿도록 하였다(Figure 1). Probe의 농도는 고정액에서 20 pmole/ μl 혹은 40 pmole/ μl 이 되도록 하였으며, 이 용액은 sciFLEXARRAYER S11 (Sciencion, Germany)을 사용한 K-CAP™의 aldehyde 처리된 표면에서 각 200 pl가 사용되었다.

Probe를 처리한 후, 25°C, 70% 습도 하에서 3시간 정치함으로써 aldehyde기와 amine기간의 반응을 유도하였다. 결합되지 않은 probe는 prehybridization buffer (2× SSPE, 0.2% SDS)를 사용하여 표면에서 제거되도록 하였다. DNA chip의 probe는 CTC (Center to center) of spot (K-MAC, Korea)에서 각 200 μm spot과 180 μm spot을 가진다.

사. 다중 PCR과 DNA chip을 위한 표준 프로토콜의 확립

표준 DNA는 각 주형의 2 pg (약 10^5 copies)을 사용하도록 한다. PCR은 총 20 μl 가 되도록 조성하며, 22-Asy primer mix (100 pmole/reaction), PC1 primer (hybridization of control, 0.2 pmole/reaction), Greenstar master mix (Bioneer, Korea)를 포함하도록 구성되어 있다. 다중 PCR의 조건은 pre-denaturation 94°C 5분, 변성 94°C 30초, 혼성 52°C 30초, 증합 72°C 30초의 각 단계를 총 40회전 진행하도록 한다. PCR 반응 후, 증폭산물은 전기영동을 통해 agarose gel 상으로 확인되었다. Hybridization은 52°C에서 300 rpm으로 4시간동안 수행하였고, 4× SSC buffer, 0.2× SSC buffer, 그리고 증류수 순서로 각 단계마다 42°C, 300 rpm으로 5분간 washing 하였다. DNA chip은 LightCycler® 480 Multi-well-plate 96, White (Roche, Korea)와 결합하여 3,500 rpm에서 2분간 원심분리 하였다. Hybridization image는 K-SCAN-CAP™을 사용하여 스캔하고 SBR (Spot/Background Ratio) 값에 따라 분석하였다.

아. 뒤영벌 시료를 사용한 DNA chip 표준 프로토콜의 적용

뒤영벌의 유충을 사용하여 total RNA를 추출한 후, 이를 1 μg 이용하여 cDNA를 합성하였으며, 표준 프로토콜에 적용하기 위해 asymmetric 다중 PCR 및 hybridization에 1 μl 를 사용하였다.

Real-Time PCR을 이용하여 1 μl 의 각 병원체 분자들을 정량하였다. Real-Time PCR은 22-Asy primer mix와 Greenstar master mix (Bioneer, Korea)를 포함하여 각 병원체 특이 primer forward/reverse를 각 5 pmole 씩 포함한 총 20 μl 가 되도록 조성하였다. Real-Time PCR 조건은 pre-denaturation 94°C 5분, 변성 94°C 30초, 혼성 52°C 30초, 증합 72°C 30초를 40회전 진행하였으며, 표준 DNA는 1.0×10^3 , 1.0×10^4 및 1.0×10^5 분자가 되도록 희석하여 사용하였다. 이후 증폭산물은 52°C에서 300 rpm으로 4시간 정치함으로써 hybridization을 수행하였고, 4 \times , 0.2 \times SSC buffer, DW를 사용하여 washing 과정을 진행하였다. 이후 Hybridization image는 K-SCAN-CAP[™]을 사용하여 스캔하고 SBR (Spot/Background Ratio) 값에 따라 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Asymmetric 22 primer mix를 사용한 다중 PCR의 최적화

온도구배 PCR(temperature-gradient PCR)은 다중 PCR에서의 최적 혼성온도의 확인과 primer에 의한 증폭을 확인하기 위함으로써, 표준 DNA 1.0×10^5 분자와 각각의 특이 primer 5 pmole/reaction을 사용하여 mid point (T_m)의 온도를 기준으로 수행 하였으며 최적화된 조건에서 검출한계를 측정하였다 (Fig. 1).

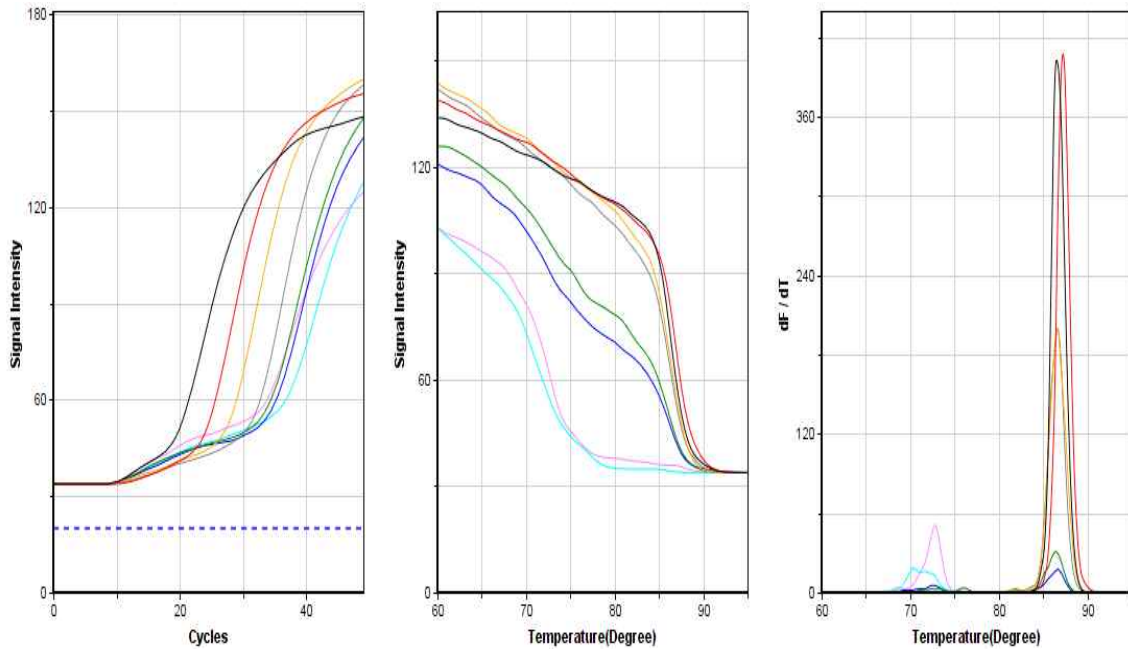


Figure 1. The amplification of *M. plutonius* (EFB)-specific DNA with specific primers using URRT-qPCR

(Left) Fluorescence curves. *M. plutonius*-specific PCR products were differently amplified depend on 10^8 - 10^0 molecules as template. (Middle) Melting-temperature analysis. (Right) The T_m s of *M. plutonius*-specific PCR products were estimated in range of 87.5-89.0°C.

11 개의 병원체의 primer 쌍은 각 PCR에서 특이적인 증폭을 나타내었고, 각 증폭은 용융 온도 분석에서 또한 특이적인 T_m 값을 가졌다. 혼성 온도 52°C를 다중 PCR의 최적 혼성 온도를 선택하였는데, 많은 증폭이 온도 구배 PCR에서의 11개의 결과에 근거하여 52°C에서 높은 형광값을 나타내기 때문이다.

다중 PCR의 최적화는 22 primer mix 각 1 pmole/reaction과 표준 DNA를 주형으로 혼합한 것을 사용하여 시도하였다. 그러나 11 다중 PCR에 의한 증폭산물의 증폭 수준이 서로 유사하지 않았다. Primer의 결합 친화력이 서로 다르기 때문에, 22 primer mix에서의 primer를 다시 선별하고, forward primer와 reverse primer 간의 비율 구성에 변화를 주는 것을 통해 각각의 증폭산물의 양과 hybridization의 효율을 증가 시키도록 22 primer mix를 재구성하였

다. 마지막으로, 고효율의 22 primer mix를 구성하고 22-Asy primer mix(각 PCR 당 100 pmole)를 명명했다(Table 2).

Table 2. Composition of 22-Asy primer mix for pathogen specific Multiplex-PCR & DNA-chip

Targets	Template(2pg)	Name of Primer	Forward primer/rxn	Reverse primer/rxn
BQCV	4.55×10^5 copies	BQ-PCR-F1/R1	4 pmole	1 pmole
CBPV	4.90×10^5 copies	CB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
DWV	5.14×10^5 copies	DW-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
IAPV	3.88×10^5 copies	KBIA-PCR-F2/R2	10 pmole	40 pmole
SBV	4.90×10^5 copies	SB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
kSBV	4.99×10^5 copies	kSB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
<i>P. larvae</i>	4.94×10^5 copies	AFB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
<i>M. plutonius</i>	4.20×10^5 copies	EFB-PCR-F1/R1	1 pmole	4 pmole
SBPV	4.68×10^5 copies	SBPV-F/C3G peptidase R	4 pmole	1 pmole
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	4.22×10^5 copies	L.fusi detection F2/R2	1 pmole	2 pmole
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4.10×10^5 copies	Klebsiella-F/R	1 pmole	4 pmole
Total primer quantity/reaction:			100 pmole	

11개의 특정 DNA 10^5 분자를 사용한 22-Asy primer mix는 올바른 PCR 증폭산물을 증폭시켰고, 9개의 target DNA 증폭의 Ct (Threshold cycles) 값은 20 - 24 cycle을 보였다 (kSBV 및 IAPV는 Ct 값에서 28 cycle을 보였다). Real-Time PCR에서 11개 증폭의 최종 형광값이 3.3 - 5.0 K를 나타냈기 때문에 hybridization은 충분하다고 판단하였다(Figure 2).

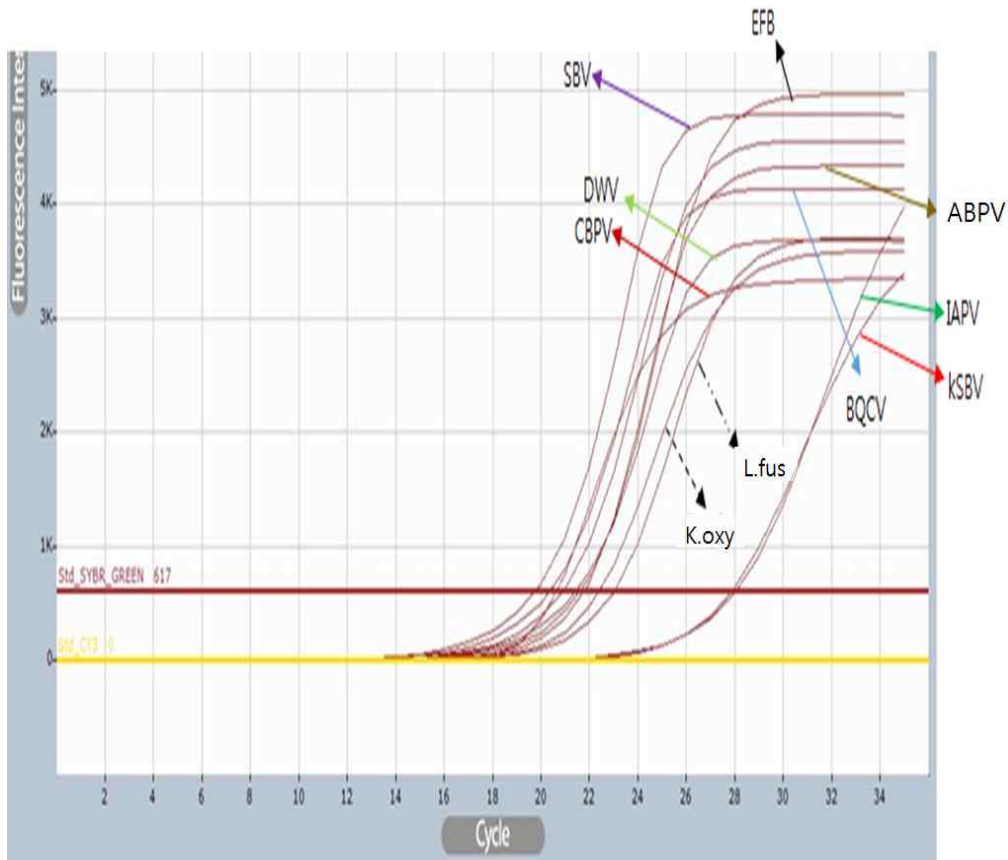


Figure 2. Multiplex PCR using 22-Asy primer mix with each pathogen-specific DNA

As template, each 10^5 molecules of pathogen-specific DNA were added. 22-Asy primer mix were used to each PCR. The Ct values of BQCV, CBPV, DWV, SBV, AFB, EFB, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus flavus* and *Nosema ceranae* were estimated 20.0–23.0 cycles, except 28.0 cycles of IAPV and kSBV. All final fluorescence intensities were pointed on 3.3–5.0 K.

나. 뒤영벌의 병원체 검출을 위한 DNA chip 생산

본 연구에서 사용된 DNA chip은 유리막대 형태로써 0.2 ml PCR tube와 지속적으로 결합된 상태로 PCR 및 hybridization을 수행 할 수 있다. microarray를 위해 tube 내의 막대는 표면에 위치하도록 사용해야 한다. DNA chip의 표면 지름은 2.0 mm이며 각 지름의 CTC (Center to Center)는 0.12 mm와 0.18 mm이다. Microarray는 49개의 oligonucleotide probe를

배치하기 위해 7 × 7 배치가 되도록 고안했다. DNA chip은 설계된 oligonucleotide probe의 설계된 spotting에 의해 생산되었고 스캔 이미지의 spot을 구획화하기 위해 hybridization control인 3개 spot을 준비하였다.

사용된 DNA chip은 특이적인 19개의 oligonucleotide probe가 한 세트에 들어있는 Pattern II이었으며 두 세트의 spotting 농도는 각각 20 pmole/μl와 40 pmole/μl이었다. 이는 중복 분석을 가능하게 하고, hybridization 과정에서 oligonucleotide probe의 더 나은 농도를 보였다(Figure 3).

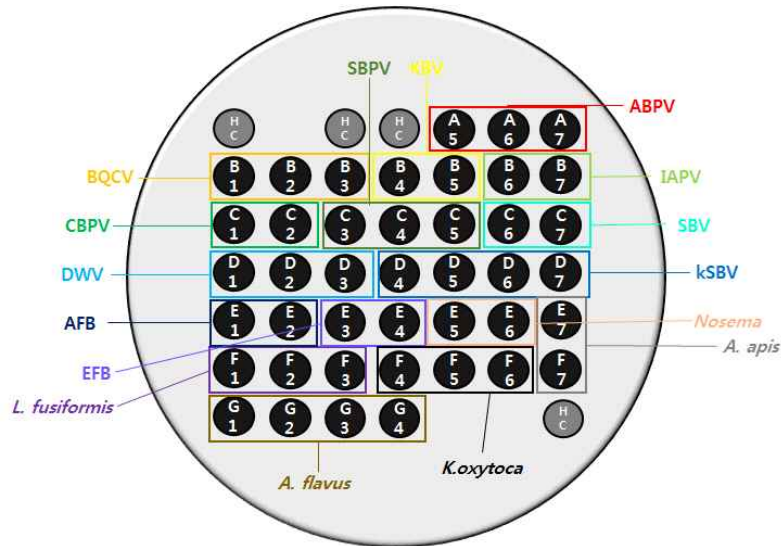


Figure 3. Positions of each spot containing oligonucleotide probes on DNA chip, K-CAP™

19 different oligonucleotide probes were mounted on spots in each set. Different quantities of oligonucleotide probes were used on each spots, 4 positions of Hybridization control (HC) were located.

SBV와 kSBV는 3개의 다른 oligonucleotide probe, DWV, IAPV, Paenibacillus laravae 그리고 Melissococcus plutoni는 2개의 서로 다른 oligonucleotide probe를 가지며, BQCV, CBPV, SBPV, *L. fusiformis* 그리고 *K. oxytoca*에 대한 oligonucleotide probe는 유전적 돌연변이와 probe의 적정성에 대해 고려하였다(Table 3).

Table 3. Positions and names of oligonucleotide probes on DNA chip, K-CAP™

위치	농도	Probe oligonucleotide	sequence (5'→3')	길이 (length)	예상 T _m (°C)
A5	40pmole	APBV-PP1-F	GATCTTTGAATGTTTGCATTATGGAA AAATTTGCTGACT	31mer	63
A6	40pmole	ABPV-PP2-F	GGAAAACGCACTAATACGACATGTTT TG	28mer	59
A7	40pmole	ABPV-PP3-F	TGTATATAATTCAACACATATTTGTG GTG	29mer	54
B1	40pmole	BQCV-PP2-R	CATCCTCAGTTGAGTTAAAGATCTTC	26mer	51.9
B2	40pmole	BQCV-PP4-R	AGAATTGACCAAAGAGTGTATTATAG C	27mer	51.2
B3	40pmole	BQCV-PP5-R	TTACTCAACTCTTGCAGAACTT	22mer	45.7
C1	40pmole	CBPV-PP3-F	TCCGTTACGCCAATGCGTCGAAGAAT T	27mer	67.4
C2	40pmole	CBPV-PP6-F	GGCGTCAACGGCAGCTCATC	20mer	60.2
D1	40pmole	DWV-PP4-F	GCAAGAGATCTTAGCGCCTAG	21mer	50.7
D2	40pmole	DWV-PP5-F	CTTCAGCGTTCGAAATTATTATCGAC	26mer	56.7
D3	40pmole	DWV-PP7-F	CGCCTAGTCATCTGTGTGTCGCGATTTG	26mer	64.4
B6	40pmole	IAPV-PP7-F	TACAGGCATAAAGATGACAATGAAG	25mer	52.3
B7	40pmole	IAPV-PP8-F	TACAGGCATAAAGATGACAATGAAGG ATTTTGG	33mer	64.5
B4	40pmole	KBV-PP1-F	GATGACTCATAGCCAACCTTCAGGAA ACC	29mer	63
B5	40pmole	KBV-PP2-F	TATACATGATGACTCATAGCCAACCT T	27mer	58
C6	20pmole	SBV-SPP6-F	GAAGTATGTGGCTCGTAACTATATTA CT	28mer	50.8
C7	20pmole	SBV-SPP7-F	GTGGCTCGTAACTATATTACTATTAG T	27mer	54

				코드번호	D-05
D4	20pmole	KSBV-PP8-F	TATGAGTTAGAAATGAAGTTTGTAGC TAATG	31mer	56
D5	20pmole	KSBV-PP7-F	GTGCGGGAAAGTTATTGTTTCTG	23mer	56
D6	20pmole	KSBV-PP5-F	TCAAGCAGCCTTGTCGCGACCT	22mer	62.8
D7	20pmole	KSBV-PP6-F	TGTCAACTAATAATGAAGGAGTT	23mer	45.0
C3	40pmole	SBPV-PP3-F	ATGATGAGCATCCAGTTGTTCGTTCT CA	28mer	62
C4	40pmole	SBPV-PP4-F	AATGTTATGAATATAACGTGCGAGGG TTTG	30mer	60
C5	40pmole	SBPV-PP5-F	CCTGTTACATGGAAACAGCATTTGGT TATAG	31mer	60
E1	20pmole	AFB-PP1-F	GTCTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCC	25mer	52
E2	20pmole	AFB-PP3-F	GTCTGGTGTTTAAGCCCGG	19mer	52
E3	40pmole	EFB-PP5-F	CCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT	24mer	69
E4	40pmole	EFB-PP3-F	GTCTGATGTGAAAGCCCC	19mer	51.5
E5	40pmole	Nosema-PP1-F	GTTTCATATTTTAAAAGTATATGAGG TGAT	30mer	51.4
E6	40pmole	Nosema-PP4-F	TATTTTAAAAGTATATGAGGTGATTA ATTGG	31mer	53
E7	40pmole	AA-PP7-R	TCAAACCTCCATCGGCTTAAGAACCG ATA	29mer	62
F7	40pmole	Apis-PP6-R	AGCAGCCGACAAACGTCGACCG	22mer	65
G1	40pmole	AF-PP6-R	CCTAAGAAGCCAGCGGCCCGCAA	24mer	68
G2	40pmole	AF-PP7-R	TAAGAAGCCAGCGGCCCG	18mer	61
G3	40pmole	AF-PP8-R	ATTGCCGCGCACTTCCATCGGCTTG	25mer	68
G4	40pmole	Flavus-PP5-R	CCCCTAAGAAGCCAGCGGCCCG	22mer	68
F1	40pmole	LF-PP2-F	AAAATTAAGCATGCATGAATATGCTT GGG	29mer	59
F2	40pmole	LF-PP3-F	GAATTACTAATAATAACCCTCATTAC GGACC	31mer	57
F3	40pmole	LF-PP4-F	GTTGCAACCCTTGGGATTTA	21mer	57
F4	40pmole	KO-PP1-F	GGGTATCGAAGAGGAAGGTATCC	23mer	57
F5	40pmole	KO-PP2-F	CGCGAAGTGCTGCTGGGTATCGAA	24mer	65
F6	40pmole	KO-PP3-F	AAGGTATCCCTTTCCGGCTCCAGCATC A	28mer	67

Spot site		Probe oligonucleotides	Probe concentration / spot		Genbank accession No.
Set 1	Set 2		Set 1 (pmole)	Set 2 (pmole)	
B1	E1	BQCV-PP2-R	20	40	EF517515
B2	E2	CBPV-PP1-F	20	40	EU122231
B3	E3	DWV-PP2-F	20	40	NC004830
B4	E4	DWV-PP4-F	20	40	NC004830
B5	E5	IAPV-PP5-F	20	40	NC009025
B6	E6	IAPV-PP6-R	20	40	NC009025
B7	E7	K.oxy-PP4-R	20	40	AF017781
C7	F7	K.oxy-PP5-R	20	40	AF017781
C1	F1	SBV-SPP3-F	20	40	AF092924
C2	F2	SBV-SPP5-F	20	40	AF092924
C3	F3	SBV-SPP6-F	20	40	AF092924
C4	F4	KSBV-PP1-F	20	40	HQ322114
C5	F5	KSBV-PP3-F	20	40	HQ322114
C6	F6	SBPV-PP1-F	20	40	EU035616
D1	G1	ABPV-PP1-F	20	40	U85263
D2	G2	ABPV-PP3-F	20	40	U85263
D3	G3	EFB-PP1-F	20	40	X75751
D4	G4	EFB-PP3-F	20	40	X75751
D6	G6	L.fus-PP3-R	20	40	CP010820
Total Probe oligonucleotides					
19					

다. 다중 PCR부터 DNA chip까지의 적용

다중 PCR은 ABPV, *Melissococcus plutonius* (EFB), SBPV, *Klebsiella oxytoca*, *Lysinibacillus fusiformis*, SBV, kSBV, DWV, IAPV, BQCV 및 CBPV의 11개의 특정 표준 DNA가 DNA chip에 적용되었다. 또한, 표준 다중 PCR, hybridization, washing 및 건조를 수행했다. 이에 대한 표준 프로토콜은 각각의 표준 DNA 1.0×10^5 분자와 22-Asy primer mix를 사용하는 다중 PCR과 4시간 동안 수행하는 hybridization과정으로 구성된다.

각각의 다중 PCR 산물은 직접적으로 hybridization 과정에 사용하였고, 이 적용은 병원체에 대한 특징적인 결과를 보였다. 일부 결과는 잘못된 격자로 인해 잘못된 SBR 값을 보였다 (Figure 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

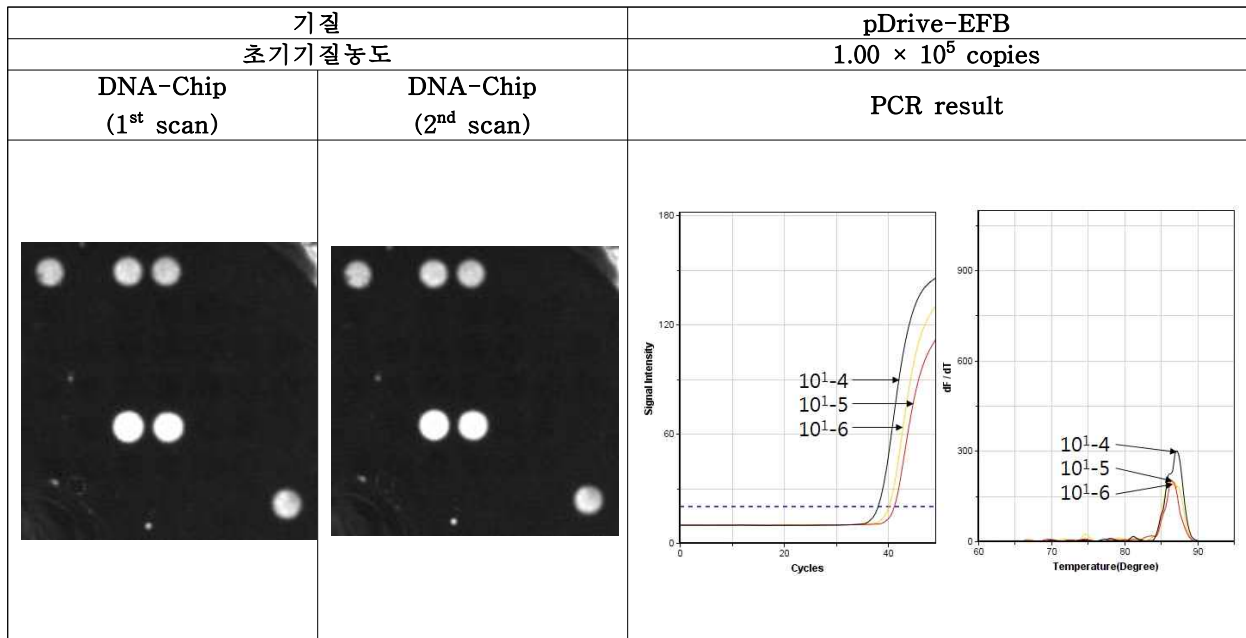


Figure 4. The fluorescence image and signal intensity of *Melissococcus plutonius* detection using 22-Asy primer mix and target DNA

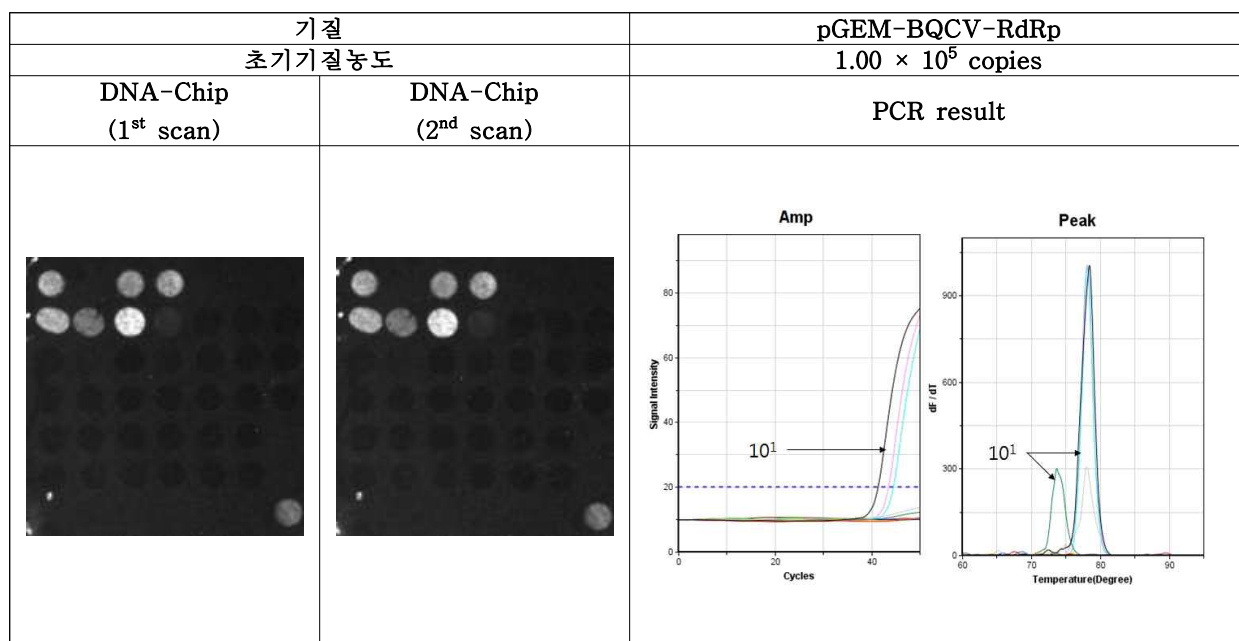


Figure 5. The fluorescence image and signal intensity of BQCV detection using 22-Asy primer mix and target DNA

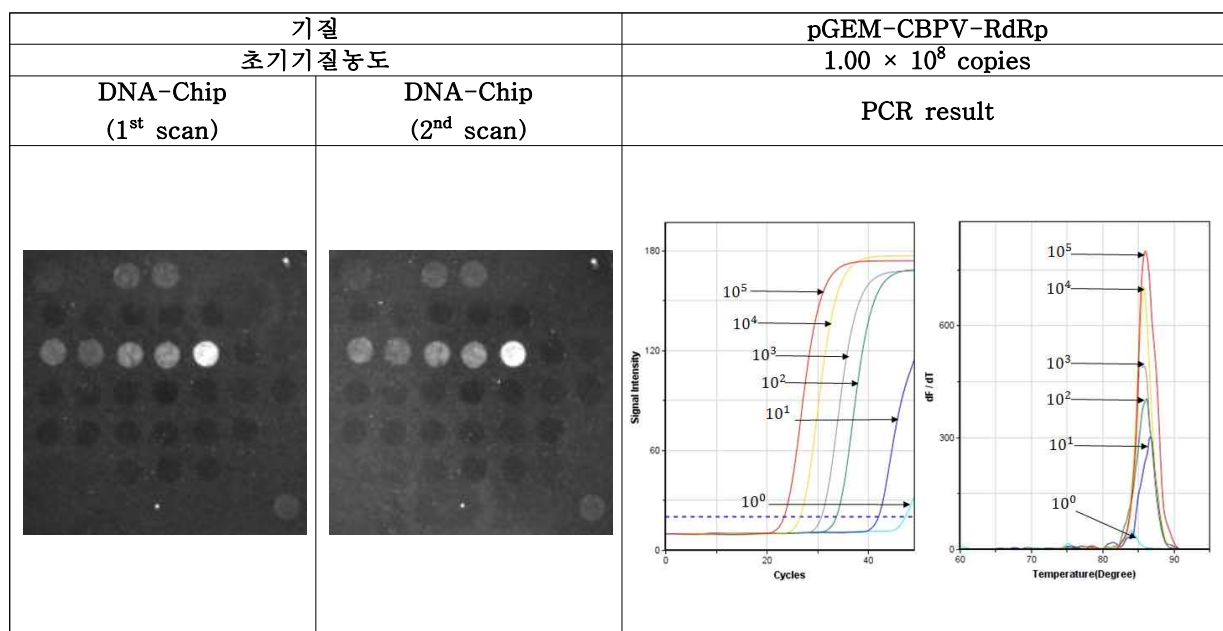


Figure 6. The fluorescence image and signal intensity of CBPV detection using 22-Asy primer mix and target DNA

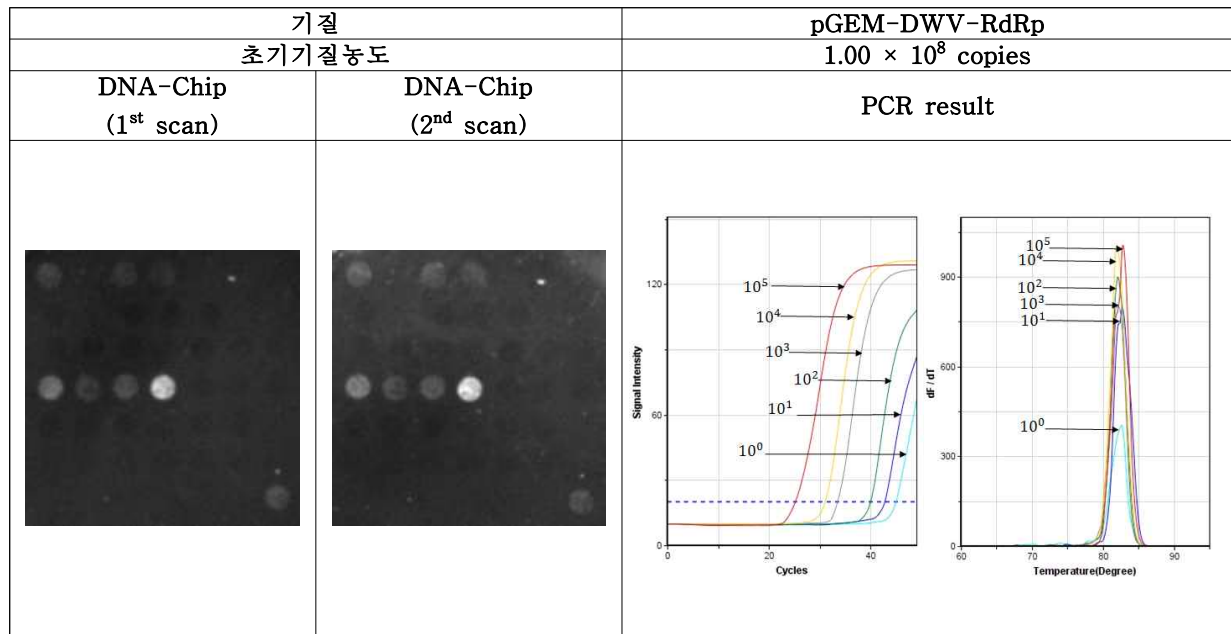


Figure 7. The fluorescence image and signal intensity of DWV detection using 22-Asy primer mix and target DNA

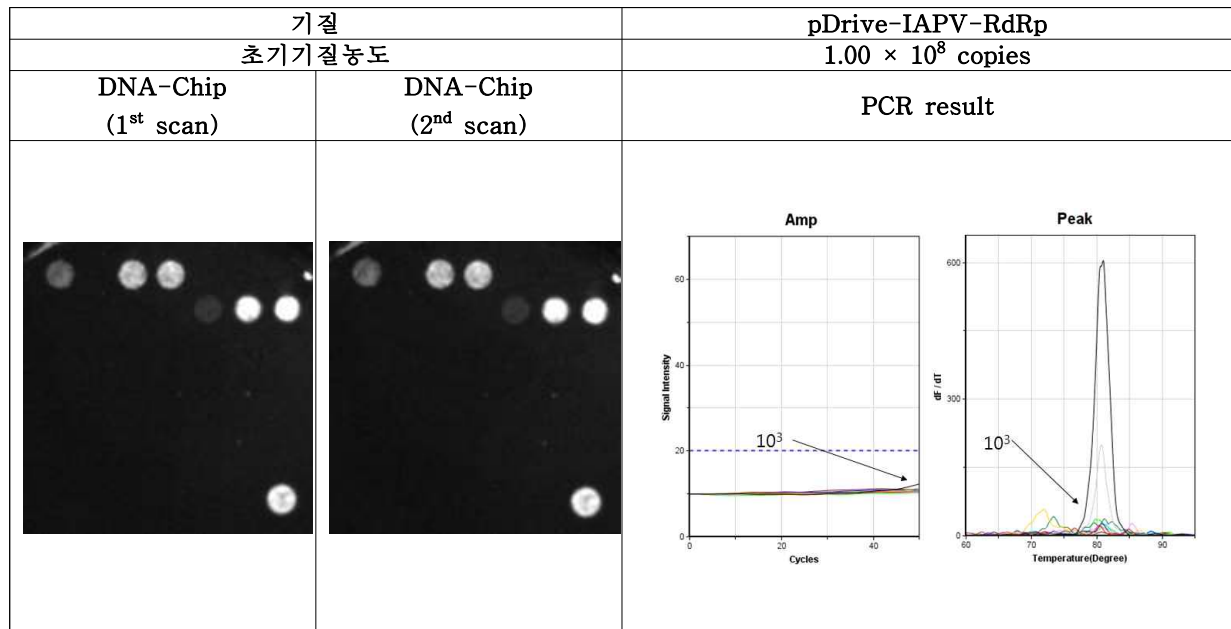


Figure 8. The fluorescence image and signal intensity of IAPV detection using 22-Asy primer mix and target DNA

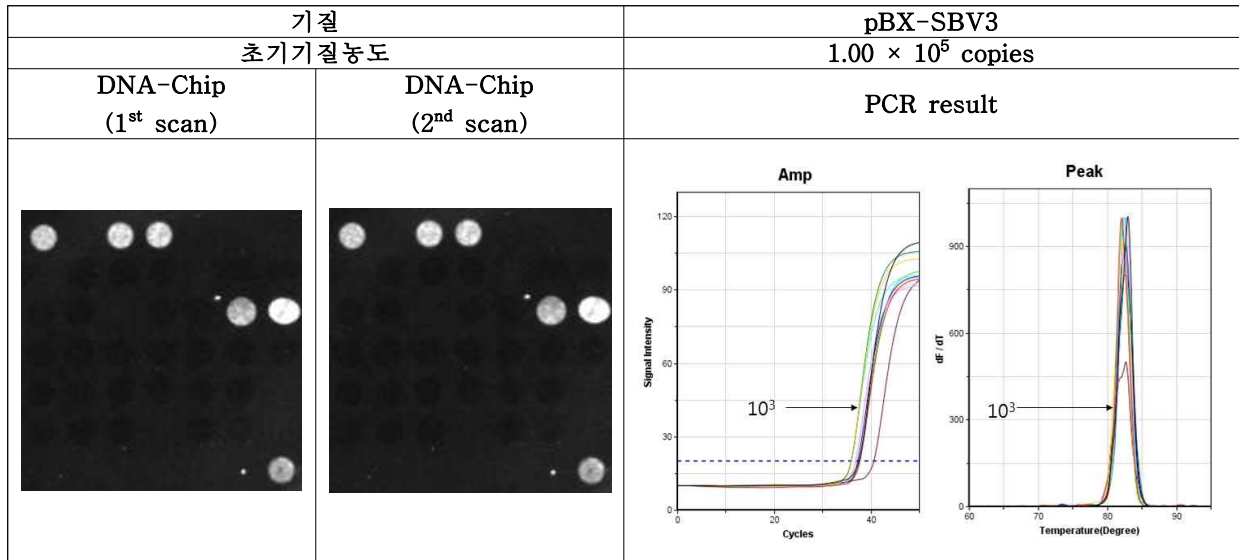


Figure 9. The fluorescence image and signal intensity of SBV detection using 22-Asy primer mix and target DNA

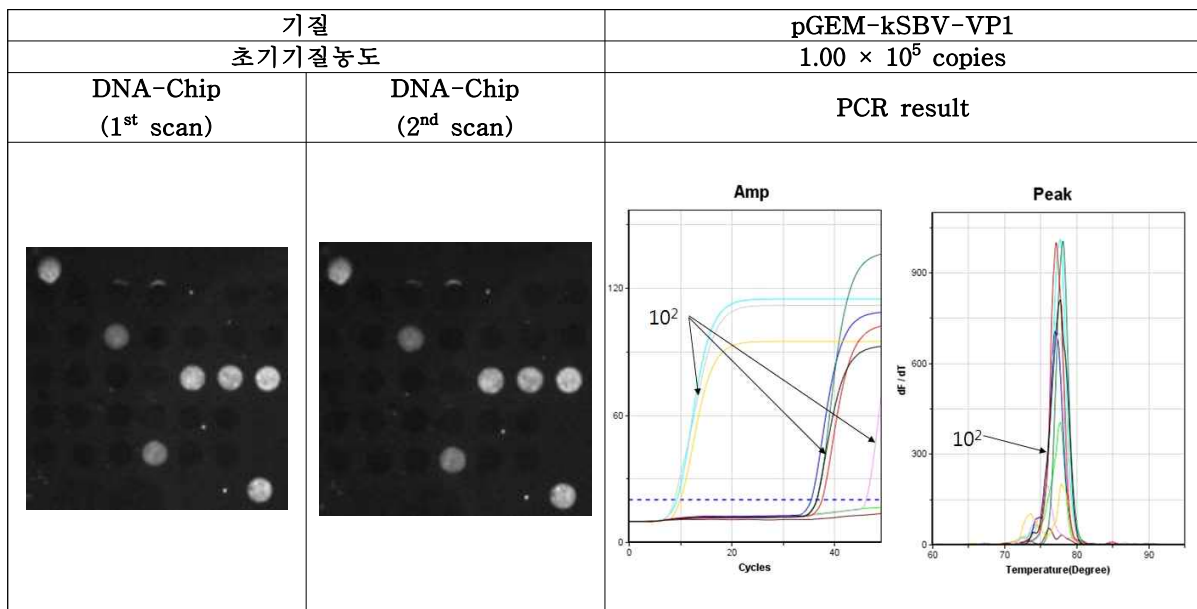


Figure 10. The fluorescence image and signal intensity of kSBV detection using 22-Asy primer mix and target DNA.

라. 뒤영벌 시료를 사용한 DNA chip 표준 프로토콜의 적용

표준 프로토콜에 의한 뒤영벌 시료의 cDNA를 이용하여 정성 검출을 수행하였다. 시료의 cDNA는 Real-Time PCR에 의해 정량되었고, 1.97×10^6 분자가 주형으로써 사용되었음을 계산할 수 있었다. 22-Asy primer mix에 의한 증폭산물은 agarose gel 상에서 예상된 특정 증폭산물과 동일한 크기임을 확인하였다. 4시간 동안 hybridization을 수행하고 washing, 건조 및 스캔을 포함한 과정을 수행했다.

스캔 이미지에서 시료는 kSBV (모든 kSBV spot에서 양성)와 SBV와 동시 감염 (부분적인 SBV spot에서 양성)인 것으로 감염된 것으로 나타났다. 그러나 SBV oligonucleotide probe의 C3 및 F3는 SBV의 양성 검출결과와는 달리 음성을 보였다. 마지막으로, 본 연구에 사용한 뒤영벌 시료는 kSBV에만 감염되었고 *Klebsiella oxytoca*, *Lysinibacillus fusiformis* 및 바이러스 성 질병과 같은 다른 질병과 동시 감염되어 있음을 확인하였다(Figure 11).

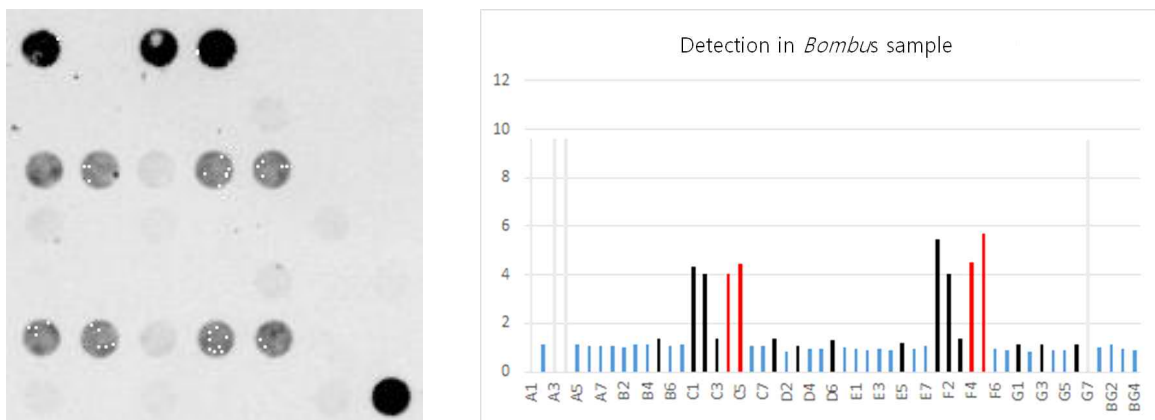


Figure 11. The application of DNA chip detection using *Bombus* sample

cDNA was used $1\mu\text{l}$ (total $20\mu\text{l}$ cDNA generation). The C4, F4, C5 and F5 of kSBV specific probes showed 4.05, 4.48, 4.52, and 5.69 on SBR value.

마. 뒤영별용 진단 DNA chip 제품화를 위한 구성과 표준 프로토콜

(1) 뒤영별용 진단 DNA chip 구성

다중 PCR을 위한 표준 DNA 2pg, 22-Asy primer mix(100 pmole/reaction), PC1 primer (hybridization of control 0.2 pmole/reaction), Greenstar master mix (Bioneer, Korea)가 포함된 PCR tube(이하 다중 PCR tube), 각 병원체의 oligonucleotide probe가 부착된 DNA chip, 4 × SSC buffer, 0.2× SSC buffer, 증류수, LightCycler® 480 Multi-well-plate 96, White (Roche, Korea)

(2) 뒤영별용 진단 DNA chip 표준 프로토콜

Step 1. 다중 PCR tube에 7 μ l의 증류수를 넣어 조성을 완료하고, pre-denaturation 94°C 5분, 변성 94°C 30초, 혼성 52°C 30초, 중합 72°C 30초의 각 단계를 총 40회전의 조건으로 PCR을 진행한다.

Step 2. PCR 반응 후, 증폭산물은 52°C에서 300 rpm으로 4시간동안 수행함으로써 hybridization을 진행한다.

Step 3. 42°C, 300rpm의 4× SSC buffer에서 1차 washing을 진행한다.

Step 4. 42°C, 300rpm의 0.2× SSC buffer에서 2차 washing을 진행한다.

Step 5. 42°C, 300rpm의 증류수에서 마지막 washing을 진행한다.

Step 6. Washing 과정을 모두 마친 DNA chip은 LightCycler® 480 Multi-well-plate 96, White (Roche, Korea)와 결합하여 3,500 rpm에서 2분간 원심분리한다.

Step 7. Hybridization image는 K-SCAN-CAP™을 사용하여 스캔하고 SBR (Spot / Background Ratio) 값에 따라 분석한다.

4. 결론 및 요약

이 연구의 목적은 뒤영벌에 대한 11종 병원체에 대한 분자 검출 방법을 개발하고 이를 바탕으로 제품화하는 것이다. 특정 primer 세트 및 oligonucleotide probe는 바이러스, 박테리아 및 곰팡이를 포함한 11종의 주요 뒤영벌 병원체의 각 nucleotide 서열을 기초로 하여 설계되었다. Primer 쌍들과 oligonucleotide probe는 11종의 주요 병원체, *Melissococcus plutonius*, 및 2종의 곰팡이 병원체를 구별하기 위해 일반 PCR, DNA chip microarray를 적용하였다.

뒤영벌 병원체에서 11종의 주요 꿀벌 병원균의 다중 PCR 및 DNA chip 검출 방법은 최초로 발견할 수 있는 다중 진단 도구이며, 확진 검사에 적용할 수 있다. 특정 primer set (22-Asy primer mix)와 oligonucleotide probe는 CBPV와 *Lysinibacillus fusiformis*를 제외한 11종의 주요 병원체에 대한 특이적인 검출이 가능하며 모든 병원체의 검증은 수행할 수 있다.

또한 본 연구를 통해 개발 및 제품화된 DNA chip의 표준 프로토콜을 통해 실험실뿐만 아니라 양봉 현장에서도 쉽게 적용할 수 있어, 양봉가로 하여금 빠른 판단과 적절한 조치가 가능하기를 기대한다.

5. 뒤영벌 수출 국가의 수출검역기준

가. 대표적으로 Guidance for Northern Ireland Bee Importer를 참고

(1) 적어도 지난 30 일 동안 American foul brood (AFB) 병이 없는 지역에서 온 것이어야 하며 원산지 반경 3 킬로미터 이내의 모든 딱정벌레를 검사해야한다. 만약 검역시 발견된다면, 뒤영벌 통을 태우거나 당국이 만족하는 수준까지 치료해야한다.

(2) 작은 벌집 딱정벌레 (*Aethina tumida*) 또는 Tropilaelaps 진드기 (*Tropilaelaps spp.*)의 침입이 적어도 100km까지 없는 원산지여야 한다.

(3) 포장재 및 포장재는 작은 벌레 딱정벌레 (*Aethina tumida*)의 알 또는 유충 또는 다른 감염 (특히 *Tropilaelaps spp.*)의 발생을 감지하기 위한 육안 검사를 거친다.

제 13 절 병원체 free 뒤영벌을 위한 system의 개발

1. 서론

한국의 토종 호박벌의 실내사육은 1995년도부터 농촌진흥청 농업과학기술원에서 연구되기 시작하여, 1996년도에는 채집 뒤영벌의 실내 정착률을 비교하여 시험하였다(이 등, 1996). 또한, 이 등(2005)은 호박벌(*Bombus ignitus Smith*)의 봉군 발육에 미치는 광의 영향을 연구하였다. 이와 같이 뒤영벌 사육효과를 향상시키기 위한 연구들이 계속 되어져왔다.

2016년 뒤영벌 병원체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법이 개발되었으며(민 등, 2016), 이는 뒤영벌 시료에 대해서 병원체 11종을 동시에 검사할 수 있는 방법이다. 실제 뒤영벌 시료를 이용한 검사에서 뒤영벌은 BQCV, *L. fusiformis*, SBV, SBPV, *P. larvae* 등이 검출되어졌다. 이를 통해 뒤영벌이 병원체 감염에 매우 취약한 것으로 판단되어 생산과정에서 병원체의 감염이 불가피한 것으로 판단되었다. 따라서, 본 연구는 뒤영벌 대량 생산 공정의 각 단계에서 뒤영벌 병원체의 검사를 진행함으로써, pathogen-free 대량생산이 가능하다고 판단하였다.

본 연구에서는 뒤영벌의 병원체 13종(즉, ABPV (Acute Bee Paralysis Virus), BQCV (Black Queen Cell Virus), CBPV (Chronic Bee Paralysis Virus), DWV (Deformed Wing Virus), IAPV (Israel Acute Paralysis Virus), KBV (Kashmir Bee Virus), SBV (Sacbrood Virus), kSBV (korean Sacbrood Virus), *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), *Mellisococcus plutonius* (*M. plutonius*)와 뒤영벌 특이병원체(후보) 3종, 즉 SBPV (Slow Bee Paralysis Virus), *Lysinibacillus fusiformis* (*L. fusiformis*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*)에 대해 free한 뒤영벌을 대량생산하는 system을 개발하고자 하였다.

2. 병원체 free 뒤영벌 생산을 위한 방법

가. 뒤영벌 실내사육을 위한 실내사육장

(1) 동물실험실(A), 사육실



- 뒤영벌 대량생산을 위한 실내 사육실(정문 및 사육실 출입문)
- 온도($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$) 및 습도($65 \pm 5\%$) 유지를 위한 밀폐된 공간(인위적 환풍 기능 있음)

(2) 교미실



- 뒤영벌을 교미시키는 박스 (750 mm × 700 mm × 810 mm; 두께, 10 mm)
- 인공 채광과 온도 조절 및 환풍 장치 시설됨
- 뒤영벌 교미를 위한 온도/습도 등 센서를 부착하여 매 분 온도를 측정하며, 이는 원격 컴퓨터에 저장됨.

(3) 뒤영벌 여왕벌의 월동용 저온고



- 여왕벌을 인공 월동시키는 장소로 상용화된 업소용 냉장고를 사용함.
- 정온 유지의 확인을 위하여 온도, 소음, 진동 기록장치 부가되었고, 정숙 운용함.

(4) 산란 및 증식실



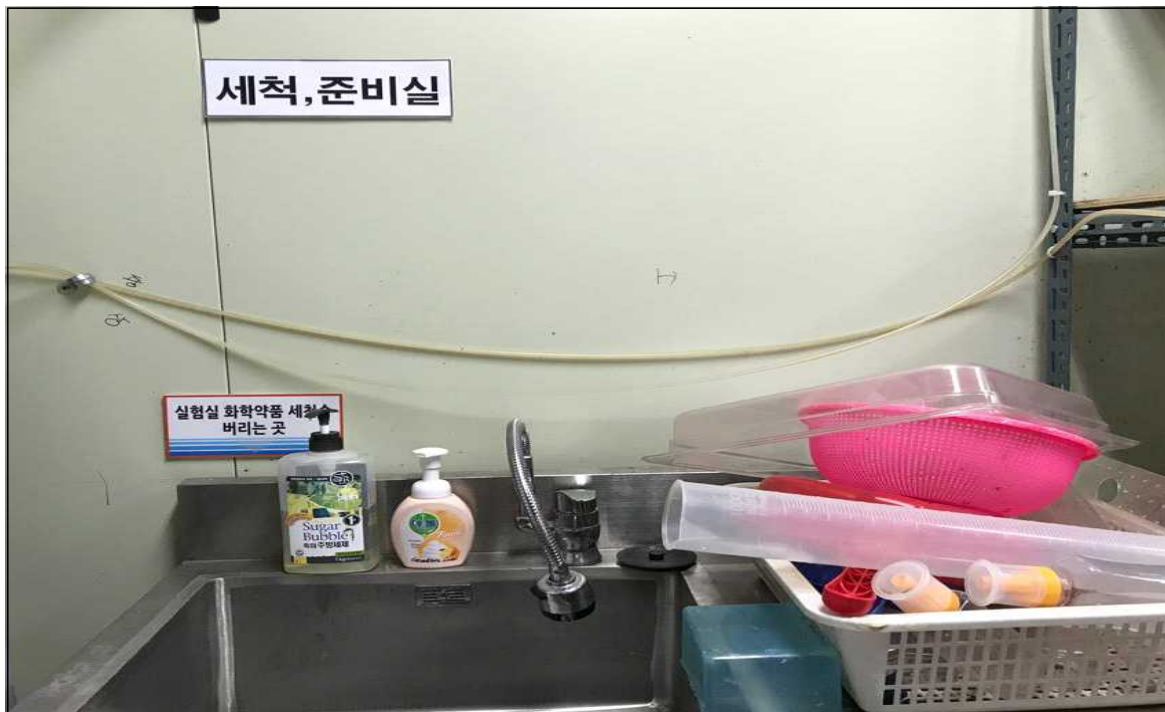
- (왼) 산란용 박스 (10.5cm × 14.5cm × 6.5cm), (오) 증식실 사진
- 월동된 여왕벌은 산란 박스에 넣어 증식실에서 초기 봉군을 형성.
- 향온향습, 환기, 기록 장치의 시설이 설비됨

(5) 봉군속성실



- 새로운 여왕벌의 봉군을 최대 성숙기까지 사육하는 곳(출하까지)
- 증식실과 겸용해서 사용 가능하지만 본 실험실에서는 따로 사용 중임.
- 향온향습시설.

(6) 세척실 및 준비실



- 뒤영벌 사육에 필요한 사육상자, 먹이통 등 사육도구를 세척하는 장소와 사육과정에 필요한 도구 및 용기, 물건을 준비

나. 무 병원체 뒤영벌의 실내 사육법

(1) 사육용 먹이 준비(화분떡 및 설탕)

- 화분떡과 40% 설탕은 121℃에서 멸균한 것들을 사용하여 병원체의 유입을 초기 차단.

(2) 교미

- 750 mm × 700 mm × 810 mm인 교미용 상자를 사용하고, 처녀여왕벌과 수벌을 1 : 6 이상의 비율로 사육함. 교미상자 안에는 멸균된 화분단자와 40% 설탕물을 공급하고, 상자바닥의 뒷부분에는 교미를 마친 여왕벌이 숨을 수 있는 공간을 제공하기 위해 부엽토로 둔덕을 만들어 교미에 적절한 환경을 만듦.
- 일주일간 교미시킨 후, 부엽토 아래 숨어있는 교미에 성공한 여왕벌을 수거하여 저온고에서 휴면 처리함.

(3) 겨울나기

- 월동 전 온도처리는 7.5℃로 2일간 혹은 12℃에서 1일간 처리함..
- 인공월동법은 2015년 영농활용 자료 ‘뒤영벌 연중 수시보급을 위한 월동기간 단축기술’을 기준으로 수행.
- 인공월동법은 우화 14일 이내에 교미한 여왕벌을 습도가 80%이상으로 유지되게 하여 펄라이트나 원예용상토로 반쯤채운 보관병에 여왕벌을 넣은 다음, 12주 이상 2.5℃에 냉장하는 방법(기준 : 뒤영벌의 생리 생태적 특성, 농촌진흥청).
- 본 연구에서 겨울나기는 냉장고를 이용한 인공냉장법을 사용하였으며, 2.5℃에서 12주를 냉장시켜 인공월동을 진행함.

(4) 휴면타파

- 인공월동 시켰던 여왕벌은 탄산가스를 1일 1회 30분간 2회 처리함으로써 휴면을 타파한 후, 산란용 상자에 넣어 사육함.

(5) 산란 준비 및 시기

- 산란용 상자(10.5cm × 14.5cm × 6.5cm)에 산란촉진자(2마리의 일벌)와 함께 넣은 월동여왕벌에 신선한 화분과 40% 설탕물 공급.
- 어두운 상태에서 사육하다가, 먹이를 공급할 때는 적색 형광등을 켜서 일주일에 2 - 3일 마다 교환하였고 화분단자는 가능한 신선함을 유지하며 충분한 양을 공급.

○ 야외에서 채집한 창설여왕벌의 산란 시기는 평균 7일 이내 이며, 실내에서 인공계대 사육한 월동여왕벌은 산란 시기가 평균 20일 이내임. 본 연구에서는 실내에서 인공계대로 사육한 월동여왕벌을 사용함.

(6) 산란 및 증식

- 보통 첫 산란, 약 25일 후에 첫 일벌이 출현하며 일벌 5마리 이상 증식되었을 때 중간크기의 상자인 증식용 상자(21.0cm × 21.0cm × 15.0m)로 옮겨 사육하거나(일벌 50개체까지).
- 바로, 큰 봉군 숙성용 종이상자(55cm × 65cm × 40cm)로 옮겨 사육.
- 일벌이 100개체 이상 나타나는 성숙기에 도달했을 때 새 여왕벌의 출현을 관찰되며, 이 처녀여왕벌은 교미를 위해 따로 분리.
- 일반적으로, 높은 산란력과 군집 생성능 등을 보인 평균 27℃로 유지하였으며, 습도는 또한, 높은 산란력과 군집 생성능을 보인 65 ± 5 %로 유지하였다(윤 등, 2010).

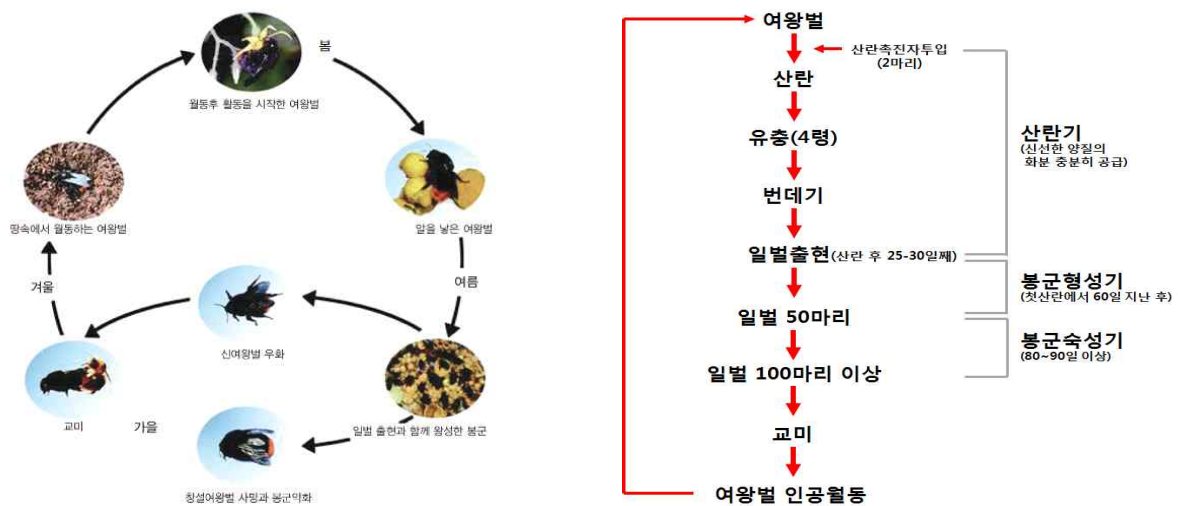


Figure 12. 뒤영벌 생활사 및 실내사육방법의 과정(뒤영벌의 생리 생태적 특성, 농촌진흥청)

다. 실내 청정사육을 위한 뒤영벌 사육 공정 단계별 병원체 검사법

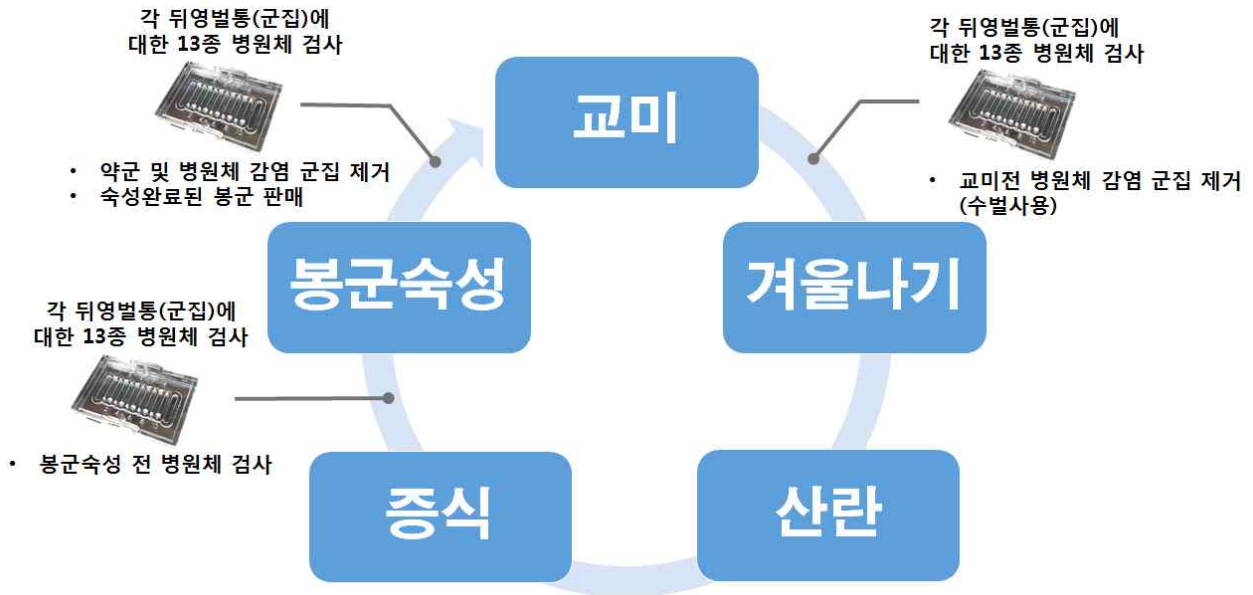


Figure 13. 실내 청정 사육을 위한 공정 단계별

- 교미 전 여왕벌과 교미를 진행할 수벌의 일부를 사용하여 병원체 검사 진행.
- 교미 전 무병원체가 입증된 뒤영벌 군집은 증식이 진행되고 증식 후 병원체 검사 진행.
- 봉군숙성이 끝난 뒤영벌 군집은 다시 병원체 검사를 진행하여 무병원체 입증.
- 무병원체임이 입증된 뒤영벌 봉군은 뒤영벌 수출입과 판매가 시작됨.

실내 청정 사육을 위해서는 사육장과 뒤영벌 군집 내의 병원체가 존재하지 않음이 매우 중요한 요소 중 하나이다.

따라서, 본 과제를 통해 개발한 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR 검사법과 DNA-chip법을 이용한 사육공정 각 단계에서의 병원체 검사를 통해 병원균 free 뒤영벌을 생산하고자하였다.

본 연구에서는 병원체의 조기 발견과 전파 방지를 위하여 병원균 free 뒤영벌의 대량 생산 system을 제시하였다. 제안된 검사법과 검사 시기 등이 적절히 활용되기를 희망하며, 상세한 검사방법은 3장의 제 11절, 12절에 기술하였다.

3. 예상 파급 효과

(1) 경제적 측면

사육 공정 현장에서 각 공정마다 병원체 검사를 통하여 병해충에 감염된 뒤영벌은 실시간으로 분리해낼 수 있어 대량 사육 공정에서도 큰 손실을 피할 수 있는 이점이 있다. 또한, 각 공정마다 무병원체 청정 뒤영벌의 생산을 인증하게 된다면 우수성을 입증하는 자료로 활용이 되어 수입국에서의 신뢰도는 상승하게 된다. 따라서, 신뢰도 상승은 곧 수출확대로 이어져 대한민국의 뒤영벌 수출에 크게 기여할 것으로 판단된다.

(2) 기술적 측면

본 기술은 국내만의 최적화된 수출용 뒤영벌 전문 생산기술을 확보한 것이며, 이는 무병원균 뒤영벌의 대량생산을 추구하는 뒤영벌 생산 사업체에 적용하여 무병원균 사업체로 인정받을 수 있으며 병원체로 인한 뒤영벌의 손실도 막을 수 있다.

4. 결론 및 요약

이 연구의 목적은 병원체 free 뒤영벌의 생산 system을 개발하고 이를 바탕으로 대량생산 체제를 구축하는 것이다. 뒤영벌 대량생산 공정 중 각 단계에서의 병원체 검사를 통해 청정 뒤영벌의 실내 대량생산을 가능하게 하고자 하였다. 병원체 검사는 교미, 겨울나기, 산란, 증식, 봉군숙성 등의 각 단계에서 실시되며, 병원체 검사 시 검출된 뒤영벌 봉군은 즉각 폐기된다.

본 연구에 의하여 최초로 개발된 뒤영벌 병원체에서 13종의 주요 꿀벌 병원균의 다중 PCR 및 DNA chip 검출 방법은 뒤영벌의 병원체의 신속 탐색 뿐만아니라, 청정(무병원균) 뒤영벌 대량생산 system에 적용하여 빠른 뒤영벌 병원체 감염여부를 검사하여 뒤영벌 봉군간의 병원체의 전파를 조기 방지할 수 있으며, 대량 손실을 막을 수 있을 것이다.

또한, 무병원체 뒤영벌의 인증은 생산된 뒤영벌의 위생 우수성을 입증할 수 있는 새로운 지표가 될 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구는 뒤영벌 수출을 위한 인증제의 기반이 될 수 있으며, 인증제를 통한 신뢰성을 발판으로 대한민국 뒤영벌의 세계화에 앞장설 수 있는 방법 중 하나일 것이다. 본 연구를 통해 뒤영벌 대량 생산 system의 설립하고 뒤영벌의 무병원성을 입증하는 인증제를 제안하였으며, 무병원성 뒤영벌의 생산방법을 통해 무병원성 뒤영벌의 대량생산이 가능할 것이라 판단하였다. 또한, 각 단계별 병원체 검사를 통해 신뢰할 수 있는 인증제 설립이 가능하여 뒤영벌 수출에 큰 기여를 할 것으로 기대한다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
연구계획 당시의 목표	연구 결과에 따른 목표 달성 내용	목표 달성도	
○ 38종 이상 꿀벌 질병진단용 RT-PCR법의 뒤영벌 질병 진단 적용	○ 38종 이상 꿀벌 질병진단용 RT-PCR법을 모두 뒤영벌 질병 진단 적용하였으며, 이 방법들 중 장점을 취합하고 신규 개발하여 가장 신속, 정확, 민감, 현장성 등이 뛰어난 초고속 PCR법으로 통합 시킴.	100%	
○ 뒤영벌 특이병원체 발굴 및 이에 대한 정량 검출법 개발	○ 뒤영벌 특이병원체의 신규 발굴은 SBPV, <i>K. oxytoca</i> , <i>Lysinibacillus fusiformis</i> 에 대하여, 초고속 정량 PCR법을 개발하고 이를 적용하였음.	100%	
○ 뒤영벌 병원체 정성/정량 검사용 RT-PCR법의 단일 시스템 개발 및 확립	○ 뒤영벌 병원체 정성/정량 검사용 RT-PCR법은 보다 우수한 초고속 PCR법으로 단일 시스템을 개발 및 확립하였을 뿐아니라, 현존 가장 우수한 유전자 검사법인 DNA-chip을 개발하여 이를 뒤영벌 병원체 검사에 사용하게 하였음.	100% 이상	
○ 병원체 정성/정량 검사법을 이용한 검체의 감염 수준 정밀 정량측정	○ 뒤영벌에 인공감염을 통하여, 또는 특이 표준 유전자를 사용하여, 병원체 정성/정량 검사법을 이용한 검체의 감염 수준 정밀 정량측정을 수행하였으며, 검사법의 정확성을 입증하였음.	100% 이상	
○ 병원체 정성/정량 검사법을 이용한 생산과정 중 감염 수준의 정밀 정량측정	○ 무병원체 뒤영벌 실험설비를 제작하고, 뒤영벌 병원체 정성/정량 검사법을 정기적으로 시행하여 생산과정 중 감염 방지를 입증함	100%	
○ 수입뒤영벌과 국내생산 뒤영벌의 가격 비교 및 경쟁력 분석, 극복 방안	○ 수입뒤영벌에서 국내 최초로 SBPV를 검출함으로써 국내생산 뒤영벌과 품질 차이를 입증함. 이는 향후 국내생산 뒤영벌의 품질우위를 보증하게 될 근거가 될 것임.	100%	
○ 국제적으로 인지도가 높고, 수출 유망국 전시회 참여 등으로 적극적으로 해외홍보	○ 국제적으로 가장 인지도가 높은 APIMONDIA (45회 세계양봉대회)에 참가하여, 홍보 및 수출 관련 정보를 수집함.	100%	
○ 각국 검역 체계의 체계에 대비한 서양 뒤영벌의 수출용 청정(무병, 무충)생산 체계 구축	○ 각국 검역 체계의 체계에 대비한 서양 뒤영벌의 검역 방법을 초고속 PCR과 DNA-chip으로 실험적 방법을 확립함. 이는 세계적으로 최첨단 검역기술이며, 향후 농수산 검역검사본부의 활용을 추진하고 있음. 아울러 이 검사방법을 활용한 수출용 청정(무병, 무충)생산 체계 구축은 고위생 품질의 뒤영벌 생산 및 수출을 위하여 긴요한 사업이 될 것임.	100% 이상	

4-2. 관련분야 기여도

- 유전자 진단 등 병원체 진단기술 분야: 본 과제에서 개발된 13종의 초고속 PCR법은 모두 세계 최고의 신속성을 보이는 유전자 진단기법이며, 이는 실험실적 검사와 현장 검사가 모두 가능한 것이다. 한편 DNA-chip은 세계 최고의 정확성을 보이는 진단 기법이며, 병원체의 확정검사를 위한 실험실적 방법으로 개발된 것이다. 다른 병원체에 대한 검출 기법의 개발에서도 크게 활용되기를 기대한다.
- 수출입 검역을 담당하는 농수산 검역검사본부: 본 연구의 결과인 뒤영벌 병원체 13종에 대한 초고속 PCR법 및 DNA-chip 검사법은 향후 검역 검사에 가장 유용한 방법으로 채택될 것임. 이 채택여부는 현재 수의과학검역원과 논의 중이며, 담당부서인 꿀벌질병관리센터와 긴밀한 협조 하에 추진 중임.
- 진단키트 제조사: 개발된 실험법은 진단키트 제조사에 의하여 우수한 품질관리 하에 생산되어야 진단검사의 품질을 보증할 수 있을 것임. 현재 초고속 PCR법은 (주)진시스템(본 과제의 참여기업)과 키트 생산을 위한 협의를 마치고 기술 공여를 진행 중이며, 관련 DNA-chip은 본 과제의 범위를 넘는 것이었으나, 전문회사인 (주)K-Mac과 같이 협력 개발하였던 것임. 그러나 2017년 하반기, (주)K-Mac의 생물진단 부분이, (주)수젠텍으로 이전되었으며, 이 이유로 DNA-chip의 생산에 관한 논의가 중단되었음. 근래 2018년 1월 (주)수젠텍이 다시 회사 체계를 정비하고, 분자진단분야의 진출을 재모색하여, 뒤영벌 병원체 특이 DNA-chip제조를 구체적으로 논의하고 있음.
- 뒤영벌 생산회사 및 생산 농민: 뒤영벌의 수출을 계획하는 뒤영벌 생산회사 및 생산 농민은 필요한 검역증명을 받기위하여 노력하여야 하며, 생산설비를 본 과제에서 제안하는 정량검사법에 따라 무병원균 뒤영벌을 생산할 수 있는 설비로 점차 전환하여야 할 것임. 무병원균 뒤영벌(Clean Bumble Bee, Pathogen-free Bumble Bee)는 수입국의 검역에서 국내생산 뒤영벌의 품질우위를 입증할 것임. 뒤영벌의 위생 품질 향상은 뒤영벌의 생산에서 생산비를 좌우하는 매우 큰 요소임.
- 뒤영벌을 사용하는 농민: 국내 뒤영벌의 사용은 이미 연간 12만 봉군이상으로 성장하였으며, 품질 및 가격 경쟁력에서 가장 우수한 뒤영벌을 사용하여야 할 것임. 이는 생산회사 및 생산 농민의 뒤영벌 품질관리 및 경쟁력을 위한 노력이 뒷받침되어야 할 것이며, 이로써 사용자인 농민도 세계 최고의 품질과 가장 저렴한 가격의 뒤영벌을 쓰는 혜택을 누릴 수 있을 것임.

제 5 장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

- 추가 연구의 필요성: 본 과제에서 개발된 뒤영벌 병원체 검출용 초고속 PCR법 및 DNA-Chip검사법은 수출입 검역에 바로 사용되기 위하여 검역검사본부의 현장적용(뒤영벌 수입 검사)에 사용되어야 할 것임. 이를 위한 검역검사본부 자체의 현장적용 연구가 필요할 것임.
- 타 연구에의 응용: 뒤영벌 생산회사 및 생산 농민들은 본 과제에서 개발된 뒤영벌 병원체 검출용 초고속 PCR법 및 DNA-Chip검사법을 생산과정에 적용하여 무병원체 뒤영벌을 생산하기 위하여 생산기술 개발을 추진하여야 할 것임
- 기업화 추진 방안: 개발된 실험법은 진단키트 제조사에 의하여 우수한 품질관리 하에 생산되어야 진단검사의 품질을 보증할 수 있을 것임.
현재 초고속 PCR법은 (주)진시스템(본 과제의 참여기업)과 키트 생산을 위한 협의를 마치고 기술 공여를 진행 중이며, 관련 DNA-chip은 뒤영벌 병원체 특이 DNA-chip제작을 구체적으로 논의하고 있음.

제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

○ 본 보고서의 제 2 장 국내외 기술개발 현황에서 현재 새로운 유전자 진단기술로 크게 부상하고 있는 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)법에 대하여 자세히 기술하였음.

본 장에서는 Twist사가 주장하는 RPA의 적용분야에 대한 설명인 Applications of Recombinase Polymerase Amplification technology을 소개한다.

TwistDx™'s TwistAmp® research kits provide ideal tools for researchers to develop tests, assays and kits relevant to their work in fields as diverse as water testing and biodefense, or food species verification and clinical or veterinary diagnostics. TwistDx can work with partners on specific assay development collaborations for research and commercial applications.

Below is a snapshot of why and how we think RPA is ideally suited to the development of rapid, highly sensitive and portable kits that can detect, diagnose and monitor in real-world settings.

Agriculture

RPA is a robust and highly sensitive technology for the development of seed testing, pathogen identification and other agricultural assays, including species authenticity testing. The isothermal amplification technology is relatively resistant to plant phenolics and other plant inhibitors of PCR, and for some applications RPA has been shown to work on crude plant samples with high specificity and sensitivity, removing the need for further nucleic acid purification. The ability to use RPA with simple, deployable lateral flow units and other disposable or battery-operated devices means that simple, highly portable assays might be developed for use in crop fields, forests and resource-limited laboratories or satellite facilities.

Biodefence

RPA could have huge potential to save lives in the biodefence sector, where assay portability, speed and reliability are essential both for routine and emergency applications. The technology could be used to develop highly sensitive and easy-to-use tests for environmental monitoring, and kits for use in pressured or volatile situations by first responders to test powders, liquids, surfaces and other materials or samples.

Water testing

RPA represents an ideal solution for on-site microorganism testing of both potable water and raw groundwater lakes and rivers. Generating results quickly and without the requirement for sample preparation, RPA could be adapted to highly portable, easy-to-use disposable test kits that water utility companies could use for scheduled or ad hoc coliform or Cryptosporidium testing of reservoirs and tap water, and environmental bodies could use to test natural water courses for polluting species.

Food testing

TwistDx™ has developed a range of TwistAmp®, TwistFlow® and TwistGlow® research-only assays for food testing. We currently offer ready-to-use kits for detecting Salmonella, Listeria and Campylobacter. These kits provide a flavour of the potential uses of RPA in the food industry, and we encourage our users and partners to harness the TwistDx™ reagents, TwistAmp® test kits and devices to develop their own food testing and species verification applications.

Medical diagnostics

Fast diagnosis of infectious diseases can literally save lives, both by enabling appropriate treatment to start immediately, and by controlling spread. It's not hard to see how RPA could feasibly be harnessed to develop point-of-care, near-patient and field-use diagnostics that provide on-the-spot results. With on-site testing there is no need to recall patients back to a clinic or field site for their results and to give them their medication. Treatment can instead be started as soon as results are viewed. This is a major advantage in rural or remote areas where patients have to travel considerable distances and communication is difficult. Contrast the use of an on-the-spot RPA test with the requirement to send clinical samples off to centralised laboratories for PCR testing, or for microbiological culturing that can take 48 hours or more. We are encouraged that users are harnessing RPA to develop rapid tests for some of the world's most deadly diseases. The work of one research group in the UK to develop an RPA-based field kit is described further on our Innovators page.

Microfluidics

RPA demonstrates a number of features that make it well suited to a diverse range of microfluidic devices. Published research has also demonstrated that RPA can easily be applied to standard digital formats. Unlike PCR, RPA is isothermal, works at a relatively low optimum temperature and can tolerate off temperatures and temperature fluctuations. This means that thermal control in very small, compartmentalised microfluidic device volumes is simplified. There is no need for preheating the master mix before delivery into the system, and at a low isothermal temperature the effects of evaporation and condensation are not a major problem. In addition, RPA has been shown to work well with surface-immobilised primers. These attributes are facilitating the design and engineering of new chip formats and structures.

Veterinary

The advantages of RPA in veterinary medicine are similar to those for human diagnostics. Whether for detecting diseases in domestic pets or monitoring the prevalence of economically important infections in agricultural livestock, RPA can be harnessed to develop rapid, highly sensitive and specific tests that can be used in the lab, at a veterinary centre or at farms and other field sites. RPA-based tests could also be used at country borders, markets and other major sites of livestock sale and transportation, to monitor and potentially help to prevent the spread of infectious diseases on a national or international scale. Our Innovators page describes the work of one group of researchers

제 7 장. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 본 과제는 일반 과제임		

제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

:해당 없음

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
[제 1세부 경기대학교]	
2016년도	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구활동종사자 온라인 안전교육 <ul style="list-style-type: none"> - 온라인교육 시행 : 연구활동종사자 안전의식 향상 및 위험 인지능력 강화. <ul style="list-style-type: none"> 사고예방 및 대처법, 위험물 취급방법등(학기당 6시간, 2회) - 신규연구활동종사자 집합교육 : 법정 안전교육 이수, 화학약품 안전, 소방안전 교육 ○ 연구활동종사자 건강검진 <ul style="list-style-type: none"> : 특수(7개 물질 사용자) 및 일반건강검진 ○ 실험·실습실 정기 안점점검 <ul style="list-style-type: none"> : 전기분야, 소방분야, 화학약품관리, 가스분야, 안전시설등. ○ 실험·실습실 정밀 안전진단 ○ 실험·실습실 안전용품 배치, 안전시설 설치, 위험물 저장창고 신축. <ul style="list-style-type: none"> : 방독면, 마스크, 내화장갑, 폐시약품통 등 실험실내 비치 : 흡휴드 보수, 비상샤워기, 밀폐형 시약장, 고압가스설비 등 설치. : 위험물 저장창고 신축 : 고압가스 저장창고 신축. 	
2017년도	
<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구실 정기 안전점검. <ul style="list-style-type: none"> : 정기안전점검(년 1회). 전기, 소방, 화학약품관리, 가스분야, 안전시설 점검. ○ 연구실 정밀 안전진단. <ul style="list-style-type: none"> - 2017.10.19.(목) ~ 10.24(화) - 실험실습실 정밀안전진단, 실내 공기질 측정 - 중점점검사항 <ul style="list-style-type: none"> : 실험 전 일상점검 실시 및 안전관리 규정 비치여부 : 사전유해인자 위험분석 실시여부 	

- : 실험실내 개인전열기 사용여부 및 콘센트 문어발식사용여부
- : 화학물질 성상별 분리보관 상태 및 화학물질 경고표지 부착여부
- : 인화물질 캐비닛 유해가스 제거장치 설치여부
- : 물질안전보건자료(MSDS) 비치여부 및 오래된 시약 보관여부
- : 비상 출입구 확보, 비상 유도표시 부착여부
- : 실험실내 공기질 측정
- : 기타 소방안전, 가스안전, 산업위생, 생물안전, 전기안전등.

○ 과학기술분야 연구활동종사자 특수 및 일반건강검진 실시

: 2017.10.12. ~ 10.17

○ “경기 안전체험 한마당” 행사실시

- 2017.05.25. 12:30 ~ 17:00

- 학생 스스로 자신의 건강과 안전을 지키는데 공감대를 형성하고 구성원들이 안전에 대한

이해와 의식 전환을 하기 위함.

: 화재대피 요령 체험훈련, 소화기 소화전 체험훈련, 심폐소생술 훈련, 지진체험차 운영 등

○ 실험·실습실 안전 환경개선공사

- 2017.04.19.~ 07.31

: 복도 비상샤워기 설치

: 밀폐형 환기식 시약장 구입.

: 인화물질 보관함 구입.

○ 연구활동종사자 온라인 안전교육 및 안전 정보망 운영

- 온라인 안전교육 시행

: 2017년 3월 ~ 2018년 2월(학기당 6시간 2회)

: 안전관리규정, 사고예방 및 대처법, 위험물 취급방법등

- 신규 연구활동종사자 집합교육(년2회)

: 화학약품 안전, 소방안전, MSDS등.

○ 연구실 화재대피 훈련 실시

: 연구 실험 중 화재 사고 발생시 초기소화, 신고, 대피훈련을 통한 인명피해를 예방하고 안전의식 고취(2017년 12월)

[제 1협동 제주대학교]

2016년도

- 연구활동종사자(학부생 포함)법정 안전교육 실시
 - 관련근거
미래창조과학부 「연구실안전환경조성에 관한 법률」 제18조(교육훈련)
제주대학교 「연구실안전관리규정」 제11조 및 제1조의2(안전교육)
 - 교육명:연구활동종사자연구실안전교육(법정의무 교육)
 - 교육대상:과학기술분야 연구활동종사(교수,조교,학부생,대학원생,연구원)
 - 교육기간:2016.10~2017.01
 - 교육시스템:제주대학교이러닝센터 홈페이지
 - 교육이수조건:12차시이상 수강

2017년도

- 연구실 사고사례 전파 및 안전관리 강화 요청
 - 사고발생 상황 대비 동종사고 재발방지 대책

	사고발생 상황 추정	동종사고 재발방지 대책
1	연구실책임자 부재 중 미사용 질산, 염산을 미상의 유기물이 담긴 산 전용 폐액통에 폐기	동종사고 재발방지 대책 연구실책임자 관리 하에 폐약처리 작업을 실시하고 미사용 시약은 폐기시 용기째 처리 폐액통에 처리 된 폐액을 확인할 수 있도록 폐액대장 부착 및 기재 엄수(유기물과 산은 분리처리 필요)
2	학부생 산 전용 폐액통을 직접 들고 이동중 폐액통 내부 화학반응에 의한 폭발 폐액통에서 유증기 발생을 확인하였으나 뚜껑을 막고 운반을 지속	폐액통 운반 시 개인보호구(보안경,보호복 등)를 반드시 착용하고 2인이상이 폐액통 운반 전용 카트사용 폐액통에서 유증기 발생시 연구실 책임자에게 즉시 알리기 및 대피
3	최초 확인자가 119, 안전환경관리자에게 사고신고 및 비상세척설비를 이용한 피해부위 긴급세척	사고발생시 비상행동요령 및 비상연락망을 육안으로 확인 가능하도록 연구실에 게시하고 관련 교육실시 시약을 취급하는 연구실에는 비상 세척설비를 설치하고 신체부위 시약 노출 시 흐르는 물에 최소 15분이상 세척
4	출입차단 및 누출시약	누출시약의 유해증기 등 2차 피해 발생을 최소화하기

제거를 위한 환기 실시	위하여 출입차단
	누출시약에 대한 MSDS/GHS 정보 확인 후 대응하고 정보가 불 분명할 시 전문가를 통하여 제거 실시

○ 연구활동종사자(학부생 포함)법정 안전교육 실시

-관련근거

미래창조과학부 「연구실안전환경조성에 관한 법률」 제18조(교육훈련)

제주대학교 「연구실안전관리규정」 제11조 및 제1조의2(안전교육)

-교육명:연구활동종사자연구실안전교육(법정의무 교육)

-교육대상:과학기술분야 연구활동종사(교수,조교,학부생,대학원생,연구원)

-교육기간;2016.10~2017.01

-교육시스템:제주대학교이러닝센터 홈페이지

-교육이수조건:12차시이상 수강

○ 2017년 연구(실험)실 안전 현장점검 실시

- 점검기간 : 2017. 7. 17 ~ 8. 11(4주간)

- 점 검 : 정기점검(1년에 1회 이상)

- 점검기관 : 한국소방협회

- 점 검 실 : 460개실

○ 연구활동종사자(학부생 포함)법정 안전교육 실시

-관련근거

미래창조과학부 「연구실안전환경조성에 관한 법률」 제18보(교육훈련)

제주대학교 「연구실안전관리규정」 제11조 및 제1조의2(안전교육)

-교육명:연구활동종사자연구실안전교육(법정의무 교육)

-교육대상:과학기술분야 연구활동종사(교수,조교,학부생,대학원생,연구원)

-교육기간;2017.10~2017.12

-교육시스템:제주대학교이러닝센터 홈페이지

-교육이수조건:12차시이상 수강

○ 2017년 찾아가는 연구실 맞춤형 안전교육

-관련근거(법률)

「연구실안전환경 조성에 관한 법률」 제18조(교육.훈련등)

제주대학교 「연구실 안전관리 규정」 제11조의 2(안전교육의 이수 및 관리)

-교육(대상)

과학기술분야 연구활동 종사자(교수,학부생 및 대학원생,연구원 및 연구보조원)

- 교육내용(일정)

시간	교육내용	강사
13:40 ~ 14:10	교육 등록 및 개회	
14:10 ~ 14:50	실험실 사고사례 및 예방관리	박갑동 원장(국제적합성평가원)
15:00 ~ 15:40	연구실 안전법 명 유해물질 안전관리	김영만 박사(KIST)
15:50 ~ 16:30	전기안전	김성철교수(충북대학교 안전공학과)
16:30 ~ 17:00	질의응답 및 평가(설문조사)	교육강사

제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번	구분 (논문 호 /특허 /기타)	논문명/특허명/기 타	소속 기관명	역할	논문게재지 / 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	다중 PCR증폭과 특이 DNA-chip을 활용한 꿀벌 주요 11종 병원체의 검 출법 개발.	경기대 학교	주저자	대한민국	-	2016.6.30	중복사사	KCI Journal of Apiculture . 31(2) : 133~146
2	논문	2017. 뒤영벌 병원 체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄 반응 검출법 개 발.	경기대 학교	주저자	대한민국	-	201.6.30	중복사사	KCI Journal of Apiculture .32(2) : 99~109
3	특허	초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영 벌 병원체 SBPV 의 검출방법	경기대 학교	주저자	대한민국	-	2018.01.19	단독사사	10-2018-0 008300
4	특허	뒤영벌 병원체 클 레브시엘라 옥시 토카 검출용 PCR 프라이머 및 이를 이용한 초고속 검 출방법	경기대 학교	주저자	대한민국	-	2017.12.29	단독사사	10-2017-0 183625
5	특허	초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영 벌 의심병원체 Lysinibacillus fusiformis의 검출 방법	경기대 학교	주저자	대한민국	-	2018.01.11	단독사사	10-2018-0 004043

본 과제의 성과지표

성과목표	화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술 이 전	사업화					기술 인 증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	출 원	등 록		제 품 화	기 술 창 업	매 출 창 출	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
										SC I	비 SC I						
1차	2			1					1	2	3	1	2	1	6		
2차	2		1			1	1		1	2	3	1	2		2		
목표	4		1	1		1	1		2	4	6	2	4	1	8		
연구기간 내 달성실적	4								0	13	17	2	5	1	11		
달성율 (%)	10 0		10 0	10 0		10 0	10 0		10 0 진 행 중	32 5	32 0	100	12 5	10 0	13 7		

1. 특허출원 (달성완료)

(가) 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌 병원체 SBPV의 검출방법 (10-2018-0008300 18.01.19)

(나) 뒤영벌 병원체 클레브시엘라 옥시토카 검출용 PCR 프라이머 및 이를 이용한 초고속 검출 방법 (10-2017-0183625 17.12.29)

(다) 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 검출방법 (10-2018-0004043 18.01.11)

(라) 초고속 PCR법을 이용한 벌집꼬마밑빠진벌레의 검출방법 (10-2017-0149858 17.11.10)

2. 기술이전(2건 모두 현재 추진중)

기 술 이 전 계 약 서

경기대학교 산학협력단(이하‘갑’이라 한다)과 (주)진시스템(이하‘을’이라 한다)는 ‘갑’이 개발하여 보유하고 있는 제1조의 대상기술을‘을’이 실시함에 있어 다음과 같이 합의하고 계약을 체결한다.

제1조 (대상기술) 본 협약에서 “기술”이라 함은 특허(실용신안) 출원된 발명과 관련한 기술과 Know-How 등을 말하며, 특허(실용신안) 출원 건은 향후 등록심사 결과에 따라 이전된 기술에 대하여 소급하여 실시권을 좌우하지 않는다.

관련 기술 : 뒤영벌 특이 13종 병원체에 대한 초고속 PCR법 및 키트 제작법

제2조 (실시권의 내용) ①‘갑’은 ‘을’에게 본 계약의 조건에 따라 본 계약기술을 대한민국에서 실시할 수 있는 전용 실시권을 허여한다. 단,‘을’이 계약기술을 국외 실시하고자 하는 경우 사전에 ‘갑’과 협의하여 본 계약과 별도로 국외실시에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

②‘갑’은 ‘을’이 본 계약기술 중 실시하지 아니하는 부분에 대하여는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.

③‘을’은 ‘갑’의 동의를 얻지 아니하면 제3자에게 본 계약기술에 대한 실시권을 이전 할 수 없으며, 본 실시권을 목적으로 하는 질권을 설정하거나, 제3자에게 실시권을 재허여하기 위해 제3자에게 본 계약기술의 실시권을 제공할 수 없다.

④ 하청제조에 관한 사항은 양 당사자 간의 사전협의를 의한다.

⑤‘갑’이 본 계약체결일 이후 계약기술로서 산업재산권을 취득하는 경우 본 계약에 의거하여‘을’은 본 계약의 내용에 따른 실시권을 가진다. 다만, 산업재산권의 출원, 보정, 등록, 유지, 실시권 설정 등록, 명의이전 등 산업재산권에 소요되는 비용은‘을’이 별도로 부담한다.

제3조 (실시기간) 본 계약의 계약기간은 계약일로부터 3년까지로 하되, 계약연장에 대한 별도의 서면 합의(혹은 통지)가 없으면 계약은 만료되는 것으로 한다.

‘을’은 본 계약체결일로부터 18개월 이내에 생산개시 일을 서면으로‘갑’에게 통보하여야 하며 생산개시일은 계약 체결일로부터 24개월 이내로 한다. 다만,‘을’의 사업화 의지가 있으나, 설비투자 및 용도 개척에 장시간이 소요되는 경우에는 ‘갑’의 서면동의를 득하여 생산개시 일을 계약 체결일로부터 최대 36개월까지 연장할 수 있다.

제4조 (기술이전료) ① 기술료는 선급기술이전료 및 경상기술 이전료로(이하“기술이전료”라 한다) 구성된다. 본 조항은 제2조 제2항에 의거 ‘을’이 계약기술의 실시권을 포기하는 경우에도 계속 유효하다.

② ‘을’은 본 해당제품 영업이익액의 1.5%에 해당하는 경상기술이전료를 생산개시일로부터 계약 만료일 동안 매년 ‘갑’에게 지급한다.

제5조 (기술자문료) ① ‘갑’이‘을’에게 본 계약기술에 대하여 기술자문 또는 기술지원을 하는 경우 ‘을’은 별도의 기술자문 계약을 체결하여 기술자문 기간, 내용, 방법 등을 협의하여야 한다.

② 기술자문료의 지급은 일시불을 원칙으로 하며, 기타 자세한 사항은 계약에 따른다.

제6조 (기술의 실시) ① ‘갑’은 본 계약기술을 현재 있는 상태로‘을’에게 제공하며, 본 계약기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여 ‘갑’은 책임지지 아니 한다.

② ‘갑’은‘을’이 기술의 실시 등에 있어서 기술적인 지원을 요청할 경우 이에 성실히 지원하여야 한다. 단, 기술적인 지원과 관련하여 발생하는 제반 비용은 별도로 ‘을’이 부담하는 것으로 한다.

제7조 (기술의 개량 등) ① ‘을’이 본 계약의 기간 중 ‘갑’이 취득하는 계약기술에 대한 개량 기술의 실시권을 취득할 것을 희망하는 때는 ‘갑’은 실시권을 허여하며, 그 대가와 조건은 별도의 합의로 정한다.

② ‘을’ 또는 ‘을’의 임원 및 피용자가 계약기술에 대한 개량기술을 개발하고자 하는 경우 ‘을’은 사전에 ‘갑’에게 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 개량기술에 대한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 다만, 개량기술에 관한 산업재산권 획득을 위한 출원, 등록 및 유지비용은‘을’이 부담하며, ‘을’은 본 계약기술과 동일한 조건으로 실시권을 갖는다.

③ ‘을’은 본 계약 체결 후 계약기술에 관한 기술개량에 연구용역이 필요한 경우, 우선적으로 ‘갑’과 별도의 연구용역 계약체결을 협의하여야 하며, ‘갑’과 ‘을’이 합리적인 조건으로 해당 연구용역 계약체결에 합의하지 못하는 경우에는‘갑’의 동의를 득하여 제3자와 연구용역 계약체결을 협의할 수 있다.

제8조 (명칭의 사용) ‘을’은 ‘갑’의 사전 동의 없이는 광고, 판매촉진, 기타 선전의 목적 및 쟁송상의 자료로 본 계약과 관련하여 지득한 정보 및 ‘갑’이 ‘을’에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제복사물을 사용하여서는 아니 되며, 또한 상기의 목적으로‘갑’의 명칭을 암시하거나 사용하여서는 아니 된다.

제9조 (비밀보장 및 기술보호) ‘을’은 계약기술에 대하여‘갑’의 사전승인 없이 어떠한 경우에도 대내외 유출 및 제3자에게 제공할 수 없으며, 이 의무는 그 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무를 포함한다.

제10조 (계약의 해지) ① 다음 각 호의 경우 또는 본 계약서상의 의무를 위반하는 경우‘갑’은 30일간의 기한을 두고 시정을 요구한 후 ‘을’이 불이행하거나, 또는 시정할 의사가 없다고 판단 시 본 계약을 해지할 수 있다.

1. ‘을’이 제4조의 기술료 지급을 정당사유 없이 지급하지 않는 경우.
2. ‘을’이 제3조의 제품 생산 개시 일을 통보하지 않거나, 생산 개시일 전이라도 본 계약기술의 실시를 포기하거나 명백히 포기한 것으로 볼 수 있는 경우.
3. ‘을’이 조업을 중단하여 상당한 기간 동안 조업이 재개될 가능성이 없다고 판단될 경우.
4. 기타‘을’에 의한 명백한 사유로 인하여 계약이행이 불가능한 경우.

②‘갑’은 다음 각 호의 경우, 본 계약을 즉시 해지할 수 있다.

1. ‘을’이 파산선고를 받는 경우.
2. ‘을’이 영업을 양도하거나 인수·합병될 경우 또는 회사청산, 회사정리 절차에 들어가는 경우.

③ 본 계약서상의 해지사유로 인해 계약이 해지되는 경우에는 ‘갑’은 기 납부한 실시료를 반환하지 아니하며,‘을’은 해지 일까지의 경상기술료를 정산하여 해지일로부터 30일 이내에‘갑’에게 지급하여야 한다.

④ 본 계약이 종료된 이후에는‘을’은 어떠한 이유로든 본 계약기술 및 관련 상표, 상호를 실시, 사용할 수 없으며‘계약기술’에 대한 기술자료 전부를‘갑’에게 반환하고 본 계약상의 모든 권리를 포기하여야 한다.

제11조 (일부 무효의 효과) 본 계약의 어느 조건 또는 어느 조항이 어떠한 이유로든지 간에 무효, 부적법, 집행 불능일 경우에는 그 무효, 부적법, 집행 불능은 이 계약의 다른 조건 또는 조항이 무효, 부적법, 집행 불능으로 인정되는 한도 안에서 그 조건 또는 조항이 이 계약에 포함되지 아니한 것으로 한다.

제12조 (분쟁해결) 본 계약의 이행 또는 쌍방의 의무 이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우에는 쌍방은 이를 원만히 상호협의로 해결하고자 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 원만히 해결되지 않을 경우에 쌍방은 사단법인 대한상사중재원의 중재결정에 의하여 해결한다.

제13조 (손해배상) 본 계약상의 의무를 위반한 당사자는 상대방에게 그로 인한 손해를 배상하여야 한다.

제14조 (신의성실 및 상호협조) ① ‘갑’과 ‘을’은 신의를 가지고 각 조항을 성실히 이행하여야 한다.

② ‘갑’은 계약이행 과정을 통하여 ‘을’의 요청이 있을 때에는 수시로 제공기술에 관하여 협조하여야 하며, ‘을’또한 필요한 사항을 ‘갑’에 적극 협조하여야 한다.

제15조 (주요사항의 변경 및 통지) ① ‘을’은 본 계약 체결 이후 법인의 주소, 대표 등 주요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 ‘갑’에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 ‘갑’의 착오는 ‘을’의 항변으로부터 면책된다.

② 양 당사자 간의 통지는 등기우편에 의해 상대방 주소 중 가장 최근의 주소로 하며, 어느 당사자가 그들의 주소나 연락장소를 변경했을 때에는 상대방에게 이 사실을 알려야 한다.

제16조 (준거법) 본 계약 및 본 계약으로부터 발생하는 당사자 간의 권리, 의무관계는 대한민국 법률에 의하여 해석되고 집행된다.

제17조 (불가항력) 본 계약의 이행에 있어 천재지변 또는 기타 불가항력인 사유로 인하여 발생한 손해 또는 손실에 대해서는 서로 책임을 지지 아니한다. 다만, 이 경우 일방은 상대방에게 가능한 한 자세하게 이 사실을 통보하여야 하며, 불가항력적인 요인이 제거된 후에는 지속적으로 의무를 이행하여야 한다.

제18조 (면책) ① ‘갑’은 본 계약기술의 특허유효성 또는 등록유지를 보증하지 않으며, ‘을’에 의한 본 계약기술의 실시가 제3자의 특허권 기타 산업재산권을 침해하지 않음을 보증하지 않는다. 또한 계약기술의 실시로 인해 ‘을’에게 발생한 제3자에 대한 기술료의 지불을 포함하여 ‘을’의 어떠한 손실에 대해서도 ‘갑’은 책임을 지지 않는다.

② 본 계약기술과 관련하여 제3자가 소송이나 청구를 제기한 경우 상대방에게 그 사실을 즉시 통보하고 상호이익을 위해 협력한다. 단, 법원의 확정판결 등으로 ‘을’이 더 이상 계약기술을 실시할 수 없는 경우 본 계약은 해지되며, 제10조 제3항에 따른다.

③ ‘을’이 직접 또는 간접적으로 본 계약에 관련된 기술에 대한 특허의 유효성을 다툰 경우에 ‘갑’은 본 계약을 해지할 수 있다.

제19조 (계약의 효력) ① 본 계약은 쌍방이 기명날인 한 날로부터 유효하다.

② 본 계약은 ‘갑’과 ‘을’간의 기술실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 이전에 ‘갑’과 ‘을’간의 모든 문서에 우선하며, 계약과 관련 있는 다른 협의나 계약은 이 계약서에 언급되고 서면으로 작성되어 권한 있는 당사자의 서명이 없는 한 그 효력이 없다. 다만, ‘갑’과 ‘을’간에 기체결한 비밀유지계약 및 양해각서의 경우에는 그러하지 아니한다.

제20조 (해석) 본 계약에 명시되지 아니한 사항 및 본 계약의 해석상 이의가 있을 때에는 쌍방의 합의에 의하여 결정한다.

본 계약서 2부를 작성하여 기명날인하고, ‘갑’과 ‘을’이 각각 1부씩 보관한다.

2018 년 1 월 22 일

(갑)

주 소 : 경기 수원시 영통구 광고산로
154-42

기 관 : 경기대학교 산학협력단

사업자등록번호 : 135-82-10872

단 장 : 김 동 원 (직인)

(발명자)

경기대학교 이공대학 생명과학과

교 수 : 윤 병 수 (인)

(을)

주 소 : 대전광역시 유성구 유성대로
1662, 310호 311호

회사명 : (주)진시스템

사업자등록번호 : 312-86-155545

대 표 : 서 유 진 (인)

첨부 : 1. 법인인감증명서 1부.

2. 사업자등록증 사본 1부.

기 술 이 전 계 약 서

경기대학교 산학협력단(이하‘갑’이라 한다)과 수젠텍(이하‘을’이라 한다)는 ‘갑’이 개발 하여 보유하고 있는 제1조의 대상기술을‘을’이 실시함에 있어 다음과 같이 합의하고 계약을 체결 한다.

제1조 (대상기술) 본 협약에서 “기술”이라 함은 특허(실용신안) 출원된 발명과 관련한 기술과 Know-How 등을 말하며, 특허(실용신안) 출원 건은 향후 등록심사 결과에 따라 이전된 기술에 대하여 소급하여 실시권을 좌우하지 않는다.

관련 기술 : 뒤영벌 특이 13종 병원체에 대한 DNA-Chip 검사법 및 DNA-Chip 제작법

제2조 (실시권의 내용) ① ‘갑’은 ‘을’에게 본 계약의 조건에 따라 본 계약기술을 대한민국에서 실시할 수 있는 전용 실시권을 허여한다. 단, ‘을’이 계약기술을 국외 실시하고자 하는 경우 사전에‘갑’과 협의하여 본 계약과 별도로 국외실시에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

② ‘갑’은 ‘을’이 본 계약기술 중 실시하지 아니하는 부분에 대하여는 실시권을 포기한 것으로 간주할 수 있다.

③ ‘을’은 ‘갑’의 동의를 얻지 아니하면 제3자에게 본 계약기술에 대한 실시권을 이전 할 수 없 으며, 본 실시권을 목적으로 하는 질권을 설정하거나, 제3자에게 실시권을 재허여하기 위해 제3자 에게 본 계약기술의 실시권을 제공할 수 없다.

④ 하청제조에 관한 사항은 양 당사자 간의 사전협의를 의한다.

⑤ ‘갑’이 본 계약체결일 이후 계약기술로서 산업재산권을 취득하는 경우 본 계약에 의거하여‘을’ 은 본 계약의 내용에 따른 실시권을 가진다. 다만, 산업재산권의 출원, 보정, 등록, 유지, 실시 권 설정등록, 명의이전 등 산업재산권에 소요되는 비용은‘을’이 별도로 부담한다.

제3조 (실시기간) 본 계약의 계약기간은 계약일로부터 3년까지로 하되, 계약연장에 대한 별도의 서면 합의(혹은 통지)가 없으면 계약은 만료되는 것으로 한다.

‘을’은 본 계약체결일로부터 18개월 이내에 생산개시 일을 서면으로 ‘갑’에게 통보하여야 하며 생산개시일은 계약 체결일로부터 24개월 이내로 한다. 다만,‘을’의 사업화 의지가 있으나, 설비투자 및 용도 개척에 장시간이 소요되는 경우에는 ‘갑’의 서면동의를 득하여 생산개시 일을 계약 체결 일로부터 최대 36개월까지 연장할 수 있다.

제4조 (기술이전료) ① 기술료는 선급기술이전료 및 경상기술 이전료로(이하“기술이전료”라 한

다) 구성된다. 본 조항은 제2조 제2항에 의거 ‘을’이 계약기술의 실시권을 포기하는 경우에도 계속 유효하다.

② ‘을’은 본 해당제품 영업이익액의 1.5%에 해당하는 경상기술이전료를 생산개시일로부터 계약 만료일 동안 매년 ‘갑’에게 지급한다.

제5조 (기술자문료) ① ‘갑’이‘을’에게 본 계약기술에 대하여 기술자문 또는 기술지원을 하는 경우 ‘을’은 별도의 기술자문 계약을 체결하여 기술자문 기간, 내용, 방법 등을 협의하여야 한다.

② 기술자문료의 지급은 일시불을 원칙으로 하며, 기타 자세한 사항은 계약에 따른다.

제6조 (기술의 실시) ① ‘갑’은 본 계약기술을 현재 있는 상태로‘을’에게 제공하며, 본 계약기술을 이용한 제품의 시장 적합성과 경제성 및 판로시장 개척 또는 영업에 대하여 ‘갑’은 책임지지 아니 한다.

② ‘갑’은 ‘을’이 기술의 실시 등에 있어서 기술적인 지원을 요청할 경우 이에 성실히 지원하여야 한다. 단, 기술적인 지원과 관련하여 발생하는 제반 비용은 별도로 ‘을’이 부담하는 것으로 한다.

제7조 (기술의 개량 등) ① ‘을’이 본 계약의 기간 중 ‘갑’이 취득하는 계약기술에 대한 개량 기술의 실시권을 취득할 것을 희망하는 때는 ‘갑’은 실시권을 허여하며, 그 대가와 조건은 별도의 합의로 정한다.

② ‘을’ 또는 ‘을’의 임원 및 피용자가 계약기술에 대한 개량기술을 개발하고자 하는 경우 ‘을’은 사전에 ‘갑’에게 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 개량기술에 대한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 다만, 개량기술에 관한 산업재산권 획득을 위한 출원, 등록 및 유지비용은‘을’이 부담하며, ‘을’은 본 계약기술과 동일한 조건으로 실시권을 갖는다.

③ ‘을’은 본 계약 체결 후 계약기술에 관한 기술개량에 연구용역이 필요한 경우, 우선적으로 ‘갑’과 별도의 연구용역 계약체결을 협의하여야 하며, ‘갑’과 ‘을’이 합리적인 조건으로 해당 연구용역 계약체결에 합의하지 못하는 경우에는‘갑’의 동의를 득하여 제3자와 연구용역 계약체결을 협의할 수 있다.

제8조 (명칭의 사용)‘을’은‘갑’의 사전 동의 없이는 광고, 판매촉진, 기타 선전의 목적 및 증송상의 자료로 본 계약과 관련하여 지득한 정보 및 ‘갑’이 ‘을’에게 제공한 보고서나 문서의 일부 또는 전부에 대한 그 원본이나 복제복사물을 사용하여서는 아니 되며, 또한 상기의 목적으로 ‘갑’의 명칭을 암시하거나 사용하여서는 아니 된다.

제9조 (비밀보장 및 기술보호) ‘을’은 계약기술에 대하여 ‘갑’의 사전승인 없이 어떠한 경우에도 대내외 유출 및 제3자에게 제공할 수 없으며, 이 의무는 그 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무를 포함한다.

제10조 (계약의 해지) ① 다음 각 호의 경우 또는 본 계약서상의 의무를 위반하는 경우 ‘갑’은 30일간의 기한을 두고 시정을 요구한 후 ‘을’이 불이행하거나, 또는 시정할 의사가 없다고 판단 시 본 계약을 해지할 수 있다.

1. ‘을’이 제4조의 기술료 지급을 정당사유 없이 지급하지 않는 경우.
2. ‘을’이 제3조의 제품 생산 개시 일을 통보하지 않거나, 생산 개시일 전이라도 본 계약기술의 실시를 포기하거나 명백히 포기한 것으로 볼 수 있는 경우.
3. ‘을’이 조업을 중단하여 상당한 기간 동안 조업이 재개될 가능성이 없다고 판단될 경우.
4. 기타 ‘을’에 의한 명백한 사유로 인하여 계약이행이 불가능한 경우.

② ‘갑’은 다음 각 호의 경우, 본 계약을 즉시 해지할 수 있다.

1. ‘을’이 파산선고를 받는 경우.
 2. ‘을’이 영업을 양도하거나 인수·합병될 경우 또는 회사청산, 회사정리 절차에 들어가는 경우.
- ③ 본 계약서상의 해지사유로 인해 계약이 해지되는 경우에는 ‘갑’은 기 납부한 실시료를 반환하지 아니하며, ‘을’은 해지 일까지의 경상기술료를 정산하여 해지일로부터 30일 이내에 ‘갑’에게 지급하여야 한다.
- ④ 본 계약이 종료된 이후에는 ‘을’은 어떠한 이유로든 본 계약기술 및 관련 상표, 상호를 실시, 사용할 수 없으며 ‘계약기술’에 대한 기술자료 전부를 ‘갑’에게 반환하고 본 계약상의 모든 권리를 포기하여야 한다.

제11조 (일부 무효의 효과) 본 계약의 어느 조건 또는 어느 조항이 어떠한 이유로든지 간에 무효, 부적법, 집행 불능일 경우에는 그 무효, 부적법, 집행 불능은 이 계약의 다른 조건 또는 조항이 무효, 부적법, 집행 불능으로 인정되는 한도 안에서 그 조건 또는 조항이 이 계약에 포함되지 아니한 것으로 한다.

제12조 (분쟁해결) 본 계약의 이행 또는 쌍방의 의무 이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우에는 쌍방은 이를 원만히 상호협의로 해결하고자 노력하여야 하며, 이러한 분쟁이나 이견이 원만히 해결되지 않을 경우에 쌍방은 사단법인 대한상사중재원의 중재결정에 의하여 해결한다.

제13조 (손해배상) 본 계약상의 의무를 위반한 당사자는 상대방에게 그로 인한 손해를 배상하여야한다.

제14조 (신의성실 및 상호협조) ① ‘갑’과 ‘을’은 신의를 가지고 각 조항을 성실히 이행하여야한다.

② ‘갑’은 계약이행 과정을 통하여 ‘을’의 요청이 있을 때에는 수시로 제공기술에 관하여 협조하여야하며, ‘을’또한 필요한 사항을 ‘갑’에 적극 협조하여야 한다.

제15조 (주요사항의 변경 및 통지) ① ‘을’은 본 계약 체결 이후 법인의 주소, 대표 등 주요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체 없이 ‘갑’에 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 ‘갑’의 착오는 ‘을’의 항변으로부터 면책된다.

② 양 당사자 간의 통지는 등기우편에 의해 상대방 주소 중 가장 최근의 주소로 하며, 어느 당사자가 그들의 주소나 연락장소를 변경했을 때에는 상대방에게 이 사실을 알려야 한다.

제16조 (준거법) 본 계약 및 본 계약으로부터 발생하는 당사자 간의 권리, 의무관계는 대한민국 법률에 의하여 해석되고 집행된다.

제17조 (불가항력) 본 계약의 이행에 있어 천재지변 또는 기타 불가항력인 사유로 인하여 발생한 손해 또는 손실에 대해서는 서로 책임을 지지 아니한다. 다만, 이 경우 일방은 상대방에게 가능한 한 자세하게 이 사실을 통보하여야 하며, 불가항력적인 요인이 제거된 후에는 지속적으로 의무를 이행하여야 한다.

제18조 (면책) ① ‘갑’은 본 계약기술의 특허유효성 또는 등록유지를 보증하지 않으며, ‘을’에 의 한 본 계약기술의 실시가 제3자의 특허권 기타 산업재산권을 침해하지 않음을 보증하지 않는다. 또한 계약기술의 실시로 인해 ‘을’에게 발생한 제3자에 대한 기술료의 지불을 포함하여 ‘을’의 어떠한 손실에 대해서도 ‘갑’은 책임을 지지 않는다.

② 본 계약기술과 관련하여 제3자가 소송이나 청구를 제기한 경우 상대방에게 그 사실을 즉시 통보하고 상호이익을 위해 협력한다. 단, 법원의 확정판결 등으로 ‘을’이 더 이상 계약기술을 실시할 수 없는 경우 본 계약은 해지되며, 제10조 제3항에 따른다.

③ ‘을’이 직접 또는 간접적으로 본 계약에 관련된 기술에 대한 특허의 유효성을 다툰 경우에 ‘갑’은 본 계약을 해지할 수 있다.

제19조 (계약의 효력) ① 본 계약은 쌍방이 기명날인 한 날로부터 유효하다.

② 본 계약은 ‘갑’과 ‘을’간의 기술실시에 관한 기본적인 사항을 규정한 것으로 이전에 ‘갑’과 ‘을’간의 모든 문서에 우선하며, 계약과 관련 있는 다른 협의나 계약은 이 계약서에 언급되고 서면으로 작성되어 권한 있는 당사자의 서명이 없는 한 그 효력이 없다. 다만, ‘갑’과 ‘을’간에 기체결한 비밀유지계약 및 양해각서의 경우에는 그러하지 아니한다.

제20조 (해석) 본 계약에 명시되지 아니한 사항 및 본 계약의 해석상 이의가 있을 때에는 쌍방의 합의에 의하여 결정한다.

본 계약서 2부를 작성하여 기명날인하고, ‘갑’과 ‘을’이 각각 1부씩 보관한다.

2018 년 2 월 일

(갑)

주 소 : 경기 수원시 영통구 광고산로
154-42

기 관 : 경기대학교 산학협력단

사업자등록번호 : 135-82-10872

단 장 : 김 동 원 (직인)

(을)

주 소 : 충청북도 청주시 흥덕구
오송읍 정중연제로 721-26

회사명 : 수젠텍

사업자등록번호 : 314-86-30542

대 표 : 손 미 진 (인)

(발명자)

경기대학교 이공대학 생명과학과

교 수 : 윤 병 수 (인)

- 첨부 : 1. 법인인감증명서 1부.
2. 사업자등록증 사본 1부.
3. 별지 : 기술요약서(계약기술이 노하우일 경우)

3. 제품화: (주)진시스템과 기술 이전 계약서 참조.

4. 매출창출: (주)진시스템의 기술 이전 계약금

5. 고용 창출
 (1) 근로계약서

고 용 (근로) 계 약 서

사용자 (주)진시스템(이하 "갑"이라 한다)과, 근로자 박지영(이하 "을"이라 한다)은 상호 신뢰를 바탕으로 근로자는 본 계약에 대한 근로를 제공하고 회사는 본 계약에 의한 근로 조건을 이행하기 위하여 본 근로계약을 체결한다.

I. 계약 당사자

사용자 (갑)	사업체명	(주)진시스템		
	소재지	대전광역시 유성구 유성대로 1662, 대전바이오벤처타운 310,311호		
	대표이사	서 유진		
근로자 (을)	성명	박 지영	생년월일	████████
	주소	██		
	입사일	2017. 12. 18.	전화	████████



II. 근로조건

제 1 조 [취업장소 및 직무]

- “갑”은 “을”의 근무장소와 직무를 아래와 같이 정하되, 회사가 업무상 필요시 변경할 수 있으며, “을”은 이에 따른다.
- 취업장소 : 위 “갑”의 사업장 소재지를 원칙으로 함.
- 취업직무 : 장비 생화학적 검증 및 연구 개발 관련 업무 및 기타 회사가 지정하는 업무

박지영

제 2 조 [근로시간 및 휴일, 휴게, 휴가]

- ① 근무시간은 1일 8시간(09시부터 18시까지), 주40시간 근무함을 원칙으로 하고 토요일은 무급휴무일로 한다.
- ② “을”은 제1항에 의한 불가피한 법정 한도 내의 시간외근로(연장,야간,휴일)에 동의하며 시간외근로에 대하여 “갑”은 월평균 포괄적으로 계산하여 지급토록 하며 휴게시간의 경우 1시간(중식시간)을 부여한다.
- ③ 유급휴일은 주휴일(일요일)과 근로자의 날(5/01일)이며, 기타 국가공휴일, 하기 휴가등은 정상 근무일이지만 개인 연차유급휴가를 대체하여 사용할 수 있다.

원본대조필

④ 근로기준법에 의거하여 연차유급휴가를 부여토록 한다.

제 3 조 [임금, 퇴직금]

임금은 총연봉으로 계약하되, 총연봉을 1/12하여 월급을 지급하며 구체적인 내용 및 금액은 연봉통지서에 의한다.

- ① 상여금과 성과급은 회사 경영실적에 필요시 따라 지급할 수 있다.
- ② "갑"은 "을"의 자유로운 의사에 따라 1년 근속 후 퇴직시에는 법정퇴직금을 지급토록 한다.
- ③ "갑"은 "을"의 연봉 책정시 "을"의 근무평가, 출퇴근 현황, 고객센터 서비스 마인드등 제반사항을 종합적으로 고려하여 결정토록 한다.

제 4 조 [임금지급]

임금은 매월 1일~매월 말일까지 계산하여 당월 25일에 지급하되, 특별히 정하는 것을 제외하고는 현금(급여통장 이체를 포함)으로 지급한다.

제 5 조 [손해배상]


"을"은 "을"의 귀책사유로 인하여 "갑"에게 재산상의 손해를 끼쳤을 경우에는 그 손해액을 배상하고 민,형사상 책임을 져야 한다. 2/21/16

제 6 조 [계약해지]

- ① "을"이 본 계약사항을 위반하여 고의 또는 과실로 "갑"에게 금전상 손해를 끼쳤을 때
- ② "을"의 신체조건, 근무태도 불량 또는 기타의 사유로 담당직무를 수행하기 곤란한 경우
- ③ "을"이 "갑"의 정당한 업무지시 또는 재규정을 준수하지 않을 때
- ④ "갑"의 중대한 경영상의 위기로 사업운영이 불가능하다고 판단할 때
- ⑤ 이외 이 계약의 당사자는 상대방이 계약을 이행하지 아니하거나 계약을 유지할 수 없는 중대한 사유가 있는 경우

제 7 조 [준수사항]

- ① "을"은 채용시 필요한 각종 서류를 즉시 "갑"에게 제출하여야 한다.
- ② "을"은 퇴사시 최소한 1개월 전에 사전 서면통보토록 하고, 업무 인수 인계 및 퇴직승인을 득한 후에 퇴직처리토록 한다.

원본대조필 

제 9 조 [수습]

- ① 입사일로부터 3개월간은 수습기간이며 급여는 수습급여를 지급한다.
- ② 수습기간 중도 또는 만료시 적성이나 능력, 인간관계 등을 판단하여 본 채용이 부적당하다고 판단될 경우에는 "을"과 합의하여 본 채용을 거부 할 수 있다.

제 10 조 [기타]

본 계약에 의한 기간과 임금 및 기타 금전의 정산이 완료됨으로써 "갑"과 "을"은 공히 본 계약의 책임을 면하며, 본 계약서에 명시하지 아니한 사항에 대하여는 회사 취업 규칙, 기타 제규정 및 노동관계법령에 따른다.

위와 같이 근로계약을 체결하고 상기 사항을 성실히 준수할 것을 서약하며 계약서 2부를 작성, 서명날인한 후 "갑"과 "을"이 각각 1부씩 보관한다.

2017 년 12 월 18 일



박지영

[갑] (주)진시스템 대표이사 서유진 (인)



[을] 근로자 박지영 (인)



원본대조필



(2) 4대보험완납증명서



발급번호 : 91-20180129-0710039

(건강 연금) 보험료 완납(납부)증명서

개인·개인사업장	성명(대표자)	박지영	생년월일	■■■■■■■■■■	
법인	상호(법인명)		사업자등록번호	--	
	성명(대표자)		생년월일		
	소재지				
종도	국가,지방자치단체,공공기관 제출용				
정수유예 또는 체납처분유예의 내역					
보험구분	유예기간	계	보험료	연체금	체납처분비
	해	당	없	음	

발급일 현재 위의 정수유예액 또는 체납처분유예액을 제외하고는
체납한 보험료, 연체금, 체납처분비가 없음을 증명합니다.

증명서 유효기간 : 2018년 02월 12일

2018년 01월 29일

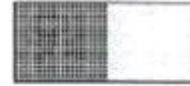
국민건강보험공단 이사장



- ※ 국민건강보험법 제14조, 제81조의3, 국민연금법 제 88조, 제95조의2, 고용보험 및 산업재해보상보험의 보험료징수 등에 관한 법률 제4조의 규정에 의하여 이 증명서를 발급 합니다.
- ※ 법인은 동일 사업자등록번호 내의 모든 사업장이 보험료 등을 완납하였을 때 발급합니다.
- ※ 이 증명서는공단 홈페이지 www.nhis.or.kr '증명서발급사실확인' 메뉴를 통해 발급번호로 위·변조 여부를 확인할 수 있습니다. (발급일로부터 90일까지) 또한 문서화단의 바코드로도 잔여여부를 확인할 수 있습니다.



(3) 산재보험 고용정보확인서



접수번호	산재보험 근로자 고용 정보 확인서		
1000-2018-9097062			
성 명	박지영	생년월일	■■■■■■■■■■
사업장명	[주]진시스템	사업장관리번호	312-86-15545-0
사업장소재지	대전광역시 유성구 유성대로 1662-0 (전민동) 대전바이오벤처타운 3층 310호		
발 급 용 도			
산재보험 근로자 고용정보			
고용일(취득일)	전보일	고용종료일(상실일)	
2017-12-18			
▷ 2이상 사업장에 고용(취득)되어 있는 경우 선택한 사업장별로 발급량을 알려 드립니다. ▷ 일용직으로 근무한 내역은 제외된 자료입니다.			
위와 같이 고용정보 내역을 확인합니다. 2018년 01월 29일 근로복지공단 유성지사장			
			

※ 이 확인서는 산재보험 고용정보 내역 확인을 위하여 근로자 본인에게 제공하는 것으로 영락중명 또는 타 기관 제출된 산재보험 영구 이의의 목적으로 활용할 수 없으며 개인정보 보호에 관한 법률 제 19조 [개인정보를 제공 받은 자의 이용, 제공 제한]에 의하여 제공받은 목적 외의 용도로 이용하거나 제3자에게 제공을 금합니다.

담당자 성명 : 최미숙

☎ : 042-620-5454



6. SCI

본 과제에의 결과로써 2018년 1월 현재 3편의 SCI저널에 투고 중이며, 각 논문의 심사 진행사항은 아래와 같다.

(1) Virus Research (SCI) : “Detection of Deformed Wing Virus (DWW) using Ultra-Rapid reverse transcription quantitative PCR and specific DNA-Chip”의 제목으로 2017.11.30. 투고하여(MS number: VIRUS 2017-672), 2018. 1. 18. 수정 후 게재의 통보를 받음. 본 논문의 수정본은 2018.1.29. 송부되었으며, 현재 게재확정을 대기 중임.

(2) Veterinarni Medicina (SCI) : “Development of an Ultra-Rapid real-time PCR system for Sacbrood Virus (SBV) genotype detection”의 제목으로 2018.1.9. 투고하여, 현재 심사결과를 대기 중임.

(3) Analytical Biochemistry: Methods in the Biological Science (SCI) : “Confirmatory detection of viral RNA by Ultra-Rapid PCR and DNA-Chips”의 제목으로 2018.1.29. 투고하여, 현재 심사결과를 대기 중임.

7. 비SCI

(1) 왕지희, 민상현, 임수진, 윤병수. 2016. 꿀벌의 석고병, 백목병 현장 진단을 위한 신속 *Ascosphaera apis* 및 *Aspergillus flavus* 검출법의 개발. Journal of Apiculture. 31(1) : 31~39

(2) 임수진, Giang Thi Huong Luong, 민상현, 왕지희, 윤병수. 2016. 역전사 실시간 Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA)에 의한 꿀벌 Black Queen Cell Virus의 신속검출. Journal of Apiculture. 31(1) : 41~50

(3) 민상현, 왕지희, 임수진, 이철우, 윤병수. 2016. 초고속 역전사 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 한국산 낭충봉아부패병 바이러스의 가장 빠른 검출법. Journal of Apiculture. 31(2) : 121~131

(4) 왕지희, 이도부, 구수진, 백문철, 민상현, 임수진, 이철우, 윤병수. 2016. 다중 PCR증폭과 특이 DNA-chip을 활용한 꿀벌 주요 11종 병원체의 검출법 개발. Journal of Apiculture. 31(2) : 133~146

- (5) 민상현, 왕지희, 임수진, 이철우, 윤병수. 2016. 꿀벌 병원성 바이러스의 정량적 검출을 위한 정량 실시간 재조합효소-중합효소 증폭법의 개발. *Journal of Apiculture*. 31(2) : 147~156
- (6) 임수진, 김정민, 이철우, 윤병수. 2017. 꿀벌 6종 주요 병원체에 대한 초고속 다중 PCR 검출법의 개발. *Journal of Apiculture*. 32(1) : 27~39
- (7) 김정민, 임수진, Tai A Truong, 왕지희, 이철우, 윤병수. 2017. 재조합효소-중합효소 증폭법 (RPA) 및 중합효소 연쇄반응법(PCR)에서 생성된 특이 DNA 증폭산물 간의 비교. *Journal of Apiculture*. 32(1) : 41~50
- (8) 이철우, 유미선, 임수진, 김정민, 조운상, 윤병수. 2017. 한국형 낭충봉아부패병 바이러스 (kSBV)의 정의를 위한 새로운 SBV 유전자형의 제안. *Journal of Apiculture*. 32(2) : 89~97
- (9) 민상현, 김정민, 임수진, 김병희, 이철우, 윤병수. 2017. 뒤영벌 병원체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법 개발. *Journal of Apiculture*. 32(2) : 99~109
- (10) 김정민, 임수진, Truong A Tai, 홍기정, 윤병수. 2017. 초고속 유전자 증폭법을 이용한 벌 집꼬마밑빠진벌레(*Aethina tumida*)의 신속한 검출 기법 개발. *Journal of Apiculture*. 32(2) : 119-131
- (11) 김소민, 임수진, 김정민, 임윤규, 윤병수. 2017. Slow Bee Paralysis Virus(SBPC) 신속 검출을 위한 초고속 역전사 중합효소 연쇄반응법의 개발. *Journal of Apiculture*. 32(3) : 171~180
- (12) 김소민, 임수진, 김정민, 김병희, Truong A Tai, 윤병수. 2017. 초고속 유전자 증폭법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 신속 검출법. 32(3) : 181~189
- (13) A-Tai Truong, Jung-Min Kim, Su-Jin Lim, Mi-Sun Yoo, Yun Sang Cho, Byoung-Su Yoon. 2017. High Level of Sequence-Variation in Sacbrood Virus(SBV) from *Apis mellifera*. 32(4) : 281~293

8. 학술발표

- (1) 조종문, 임윤규. 2016. Precision apiculture based on ubiquitous sensor network technology. 한국실험동물학회 동계심포지엄.
- (2) Sang-hyun Min, Ji-hee Wang, Su-Jin Lim, Byoung-su Yoon. 2016. Development Novel method for Korean Sacbrood Virus Quantitative Detection. 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회.
- (3) 왕지희, 민상현, 임수진, 이도부, 백문철, 윤병수. 2016. 12종 꿀벌 병원체에 대한 진단용 DNA chip의 개발. 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회
- (4) Su-Jin Lim, Giang Thi Huong Luong, Ji Hee Wang, Sang Hyun Min, Byoung-Su Yoon. 2016. Rapid Detection of Black Queen Cell Virus from Honeybee by Real-Time Revombinase polymerase Amplification. 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회
- (5) 조종문, 임윤규. 2016. Development of a sandwich ELISA for quantification of bovine colostrum IgG using monoclonal anti-artiodactyl IgG specific antibodies. KSPVM Symposium.
- (6) 김민규, 임윤규. 2016. Development of specific monoclonal anti-bear IgG (*Ursus thibetanus ussuricus*). KSPVM Symposium.
- (7) 왕지희, 민상현, 임수진, 이도부, 백문철, 윤병수. 2016. 다중 PCR증폭과 특이 DNA-Chip을 활용한 꿀벌 주요 11종 병원체의 검출법 개발. 2016 한국양봉학회 추계학술대회.
- (8) Su-Jin Lim, Sang-Hyun Min, Ji-Hee Wang, Byoun-Su Yoon. 2016. The Decelopment of Ultra-Rapid Multiplex Detection Method for 6 Species Maor pathogens of Honeybee. 2016한국양봉학회 추계학술대회.
- (9) 민상현, 왕지희, 임수진, 윤병수. 2016. Development of Comprehensive detection method using multiple real-time PCR against *Bombus* spp. 2016 한국양봉학회 추계학술대회.

- (10) 이철우, 윤병수. 2017. 한국형 낭충봉아부패병 및 벌집밑빠진벌레감염증에 대한 꿀벌 질병 제어 전략들의 제안. 2017 한국양봉학회 춘계학술대회
- (11) 김정민, 임수진, Truong A Tai, 이철우, 윤병수. 2017. Small Hive Beetle(SHB)의 Cytochrome Oxidase Subunit I (COX I) 유전자를 이용한 초고속 PCR 검출법의 개발. 2017 한국양봉학회 춘계학술대회.
- (12) 이철우, 임수진, 김정민, 윤병수. 2017. 낭충봉아부패병 바이러스 (SBV)의 Polyprotein의 Coding Sequence의 특정 결핍 영역에 의한 새로운 유전자형의 제안. 2017년 한국양봉학회 춘계학술대회.
- (13) 임수진, 김정민, Truong A Tai, 이철우, 윤병수. 2017. 초고속 PCR과 DNA-chip을 이용한 꿀벌 병원체 검출법. 2017년 한국양봉학회 춘계학술대회.
- (14) 임수진, 김정민, Truong A Tai, 윤병수. 2017. 초고속 역전사 실시간 PCR과 특이 DNA-Chip을 이용한 꿀벌 병원체 Deformed Wing Virus의 확정검사법. 2017 한국양봉학회 추계학술대회.
- (15) 김정민, 임수진, Truong A Tai, 윤병수. 초고속 RNA 추출, 초고속 Real-Time PCR 및 DNA chip 확진 검사를 통한 kSBC 특이 유전자의 초고속 검출법 개발. 2017 한국양봉학회 추계학술대회.
- (16) A-Tail Truong, Jung-Min Kim, Su-Jin Lim, Mi-Sun Yoo, Yun Sang Cho, Byoung-Su Yoon. 2017. Sacbrood Virus(SBV) genotypes detection by Ultra-Rapid Real Time PCR. 2017 한국양봉학회 추계학술대회.
- (17) 윤병수. 2017. Development of detection method using Ultra-rapid PCR and DNA-chip against 11 major pathogens in honeybee. 45th APIMONDIA International Apicultural Congress.





9. 교육지도

(1) 2016 뒤영벌 관련 실험동물 안전교육 (1차년도 연차실적보고서)

교육 : 뒤영벌 병원체 검출 관련 교육 지도 현황

장소 : 경기대학교 생명과학과

일시 : 2016. 2. 1 (월요일)

			
장 소	경기대학교 8102호	장 소	경기대학교 8118-A호
내 용	2016년 뒤영벌 관련 실험동물 안전교육	내 용	2016년도 뒤영벌 사육 관리교육
			
장 소	경기대학교 8107호 실험실	장 소	경기대학교 8106호 실험실
내 용	2016년 뒤영벌 관련 실험동물 안전교육	내 용	2016년 뒤영벌 관련 분자 진단 실험실 안전교육

(2) 2017 동계양봉 지도자교육 꿀벌과 양봉경영

일 시 : 2017.12.26. ~ 2017.12.28.

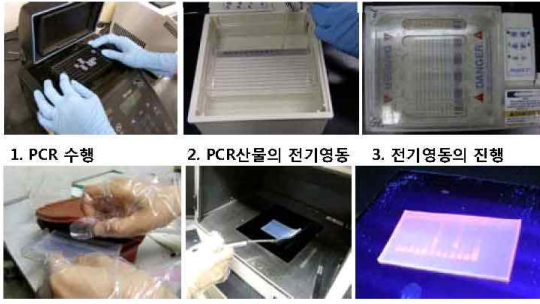
장 소 : 서울대학교 관악캠퍼스 호암교수회관 별관 SK게스트하우스

꿀벌의 전염병: 진단 및 방제

2017. 2. 22

윤병수
경기대학교 자연과학대학 생명과학과 교수
한국꿀벌질병연구소 소장

3-1. PCR 검출



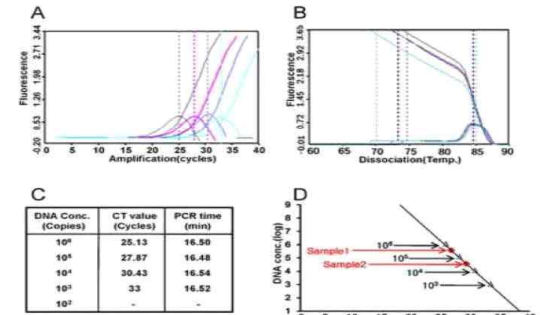
1. PCR 수행
2. PCR산물의 전기영동
3. 전기영동의 진행
4. 전기영동체를 염색
4. 자외선 조사기로
5. 전기영동상의 관찰

낭충봉아부패병 (SBV)

SBV (Sacbrood Virus)
원인 : Sacbrood Virus (SBV)



3-3. 실시간 초고속 PCR 검출

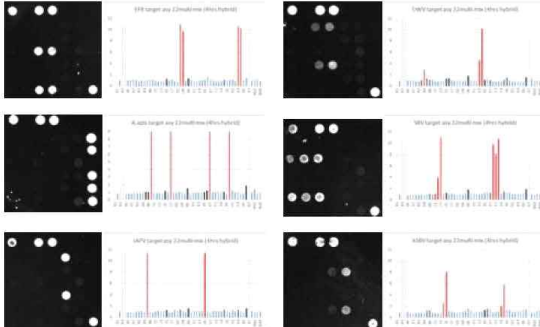


DNA Conc. (Copies)	CT value (Cycles)	PCR time (min)
10 ⁶	25.13	16.50
10 ⁵	27.87	16.48
10 ⁴	30.43	16.54
10 ³	33	16.52
10 ²	-	-

3-1. PCR 검출

- **중합효소연쇄반응(PCR):** 생물체의 유전물질인 DNA, RNA에서 특정 염기서열만 수억배로 증폭시키는 실험 기술.
- **병원체의 PCR검출법:** 특정 병원체의 특이 염기서열을 증폭시켜, 그 특정 병원체가 시료 중 존재함을 증명하는 병원체 검출법.
- 예: 낭충봉아부패병(SBV)바이러스의 특이 염기서열인 5-ACCAACCGATTCTCAGTAG, 5-TCTTCGTCCACTCTCATCAC이 유충 시료 중에 존재하는지를 PCR로 증명. 증폭되면 존재/안되면 부존.
 - DNA
 - ✓ 미국부저병(afb), 유럽부저병(efb), 백목병(cb), 석고병(sb), 노제미(nosema)
 - RNA(cDNA)
 - ✓ 낭충봉아부패병(sbv), 급성골열마비병(abpv), 날개불구병(dwv), Black Queen Cell Virus(bqcv), Kashmir Bee Virus(kbv), 만성골열마비병(cbpv), 이스라엘급성골열마비병(apv)

3-4. 병원체 확정을 위한 DNA-Chip



10. 인력양성(달성완료)

- (1) 2016년 : 3명 (이학석사 - 용소정, 이주성, 루옹티홍장)
- (2) 2017년 : 2명 (이학석사 - 민상현, 왕지희)

11. 정책활용 (1차년도 연차실적 계획서) - 달성완료

[정책심의중]

시책명 : 꿀벌질병 방역관리방안 마련

- 낭충봉아부패병 및 SHB(작은벌집밑빠진벌레)감염증에 대한 대책

건의일 : 2016.11.04.

시행일 : 2016.12.01.

주관부처 : 농림축산식품부

12. 홍보전시 (달성완료)

- (1) 지방 TV방송 : 춘천MBC

2017.12.21. p.m 11:00 방송 : “꿀벌의 죽음, 풍요의 종말”



(2) 포스터 전시

(1) 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-11

The Development of Rapid Detection Method against *Ascospaera apis* and *Aspergillus flavus* for

On-site Diagnosis of Chalkbrood and Stonebrood in Honey bee

(2) 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-16

Development of point of care diagnostic for Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) in Honeybee using Ultra-fast High Performance PCR (UF-HP-PCR)

(3) 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-19

Development of detection-method against korean Sacbrood Virus (kSBV) using Real-time isothermal Recombinase polymerase amplification (RPA)

(4) 2016년 한국양봉학회 추계학술대회. P-01

Evaluation and Application of DNA Chip using recombinase polymerase amplification for detection against honey bee pathogens

(5) 2016년 한국양봉학회 추계학술대회. P-02

Overexpression of capsid protein(VP3) of Korean Sacbrood Virus in *E.coli* system

(6) 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-03

Development of rapid detection method using ultra-fast high-performance real-time PCR against

Bombus spp.

(7) 2016년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-07

The Development of Ultra-Rapid Multiplex Detection Method for 7 Species Major Viral Pathogens of Honeybee

(8) 2017년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-14

특이 DNA 증폭에 있어 재조합효소-중합효소-증폭법(RPA)과 중합효소 연쇄반응법(PCR) 간 특성들

(9) 2017년 한국양봉학회 춘계학술대회. P-15

초고속 PCR과 DNA-chip을 이용한 Deformed Wing virus 확정 검사법의 개발

(10) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-8

How fast could we detect Acute bee paralysis virus (ABPV) from infected honeybee in apiary?

(11) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-9

How rapid could I detect Black Queen Cell Virus (BQCV) from infected honeybee in apiary ?

(12) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-13

초고속 실시간 PCR과 특이 DNA-Chip을 이용한 뒤영벌 주요 10종 병원체의 확정 검사법

(13) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-14

High level of sequence-variation in Sacbrood virus (SBV) from *Apis mellifera*

(14) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-15

국내 장수말벌 (*Vespa mandarinia*)로부터 꿀벌 주요 11종 병원체의 특이 유전자 증폭

(15) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-27

꿀벌 병원성 바이러스 Chronic Bee Paralysis Virus의 초고속 검출법 개발

(16) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-28

꿀벌 병원성 바이러스 Kashmir Bee Virus의 초고속 검출법의 개발

(17) 2017년 한국양봉학회 추계학술대회. P-29

봉변을 사용한 *Apis mellifera*의 CO I 유전자의 정량분석

제 11 장. 기타사항

<본 제 11 장에는 본 과제에서 출원한 특허 4건의 내용을 기술하였음>

	코드번호	D-13
제 1 절. 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌의 병원체 SBPV의 검출방법		
【서지사항】		
【서류명】 특허출원서		
【출원구분】 특허출원		
【출원인】		
【명칭】 경기대학교 산학협력단		
【특허고객번호】 2-2005-016990-7		
【대리인】		
【명칭】 특허법인신지		
【대리인번호】 9-2010-100061-8		
【지정된변리사】 박진석, 이헌수, 유경열, 문호지		
【포괄위임등록번호】 2016-017078-4		
【발명의 국문명칭】 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌의 병원체 SBPV의 검출방법		
【발명의 영문명칭】 Method for detecting Slow Bee Paralysis Virus, a pathogen of <i>Bombus terrestris</i> using ultra-rapid Polymerase Chain Reaction technique		
【발명자】		
【성명】 윤병수		
【성명의 영문표기】 Yoon Byoung Su		
【발명자】		
【성명】 김소민		
【성명의 영문표기】 Kim So Min		

【발명자】

【성명】 임수진

【성명의 영문표기】 Lim Su Jin

【발명자】

【성명】 김정민

【성명의 영문표기】 Kim Jung Min

【발명자】

【성명】 김병희

【성명의 영문표기】 Kim Byoung Hee

【발명자】

【성명】 민상현

【성명의 영문표기】 Min Sang Hyun

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【공지예외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 한국양봉학회 발표

【공개일자】 2017.09.30

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 115067-02

【부처명】 농림축산식품부

【연구관리 전문기관】 농림수산기술기획평가원

【연구사업명】 수출전략기술개발사업

【연구과제명】 뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역 관련 기술들의 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 경기대학교 산학협력단

【연구기간】 2015.12.18 ~ 2017.12.17

제 2 절. 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 검출 방법

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 경기대학교 산학협력단

【특허고객번호】 2-2005-016990-7

【대리인】

【명칭】 특허법인신지

【대리인번호】 9-2010-100061-8

【지정된변리사】 박진석, 이헌수, 유경열, 문호지

【포괄위임등록번호】 2016-017078-4

【발명의 국문명칭】 초고속 PCR법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 검출 방법

【발명의 영문명칭】 Method for detecting *Lysinibacillus fusiformis*, a suspicious pathogen of *Bombus terrestris* using ultra-rapid Polymerase Chain Reaction technique

【발명자】

【성명】 윤병수

【성명의 영문표기】 Yoon Byoung Su

【발명자】

【성명】 김소민

【성명의 영문표기】 Kim So Min

【발명자】

【성명】 임수진

【성명의 영문표기】 Lim Su Jin

【발명자】

【성명】 김정민

【성명의 영문표기】 Kim Jung Min

【발명자】

【성명】 김병희

【성명의 영문표기】 Kim Byoung Hee

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【공지예외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 한국양봉학회 발표

【공개일자】 2017.09.30

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 115067-02

【부처명】 농림축산식품부

【연구관리 전문기관】 농림수산기술기획평가원

【연구사업명】 수출전략기술개발사업

【연구과제명】 뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역 관련 기술들의 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 경기대학교 산학협력단

【연구기간】 2015.12.18 ~ 2017.12.17

제 3 절. 뒤영벌 병원체 클레브시엘라 옥시토카 검출용 PCR 프라이머 및 이를 이용한 초고속 검출방법

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 경기대학교 산학협력단

【특허고객번호】 2-2005-016990-7

【대리인】

【성명】 박상훈

【대리인번호】 9-2011-000209-2

【포괄위임등록번호】 2015-021332-5

【발명의 국문명칭】 뒤영벌 병원체 클레브시엘라 옥시토카 검출용 PCR 프라이머 및 이를 이용한 초고속 검출방법

【발명의 영문명칭】 PCR PRIMERS AND ULTRA RAPID REAL TIME PCR METHOD FOR DETECTING KLEBSIELLA OXYTOCA

【발명자】

【성명】 윤병수

【특허고객번호】 4-2013-059350-8

【발명자】

【성명】 임수진

【성명의 영문표기】 LIM Soo Jin

【발명자】

【성명】 김정민

【성명의 영문표기】 KIM Jung Min

【발명자】

【성명】 김병희

【성명의 영문표기】 KIM Byung Hee

【발명자】

【성명】 김소민

【성명의 영문표기】 KIM So Min

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 2

【서열목록 전자파일】 미첨부

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 115067-02

【부처명】 농림수산식품부

【연구관리 전문기관】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 수출전략기술개발

【연구과제명】 뒤영벌 수출입을 위한 생물학적 검역 관련 기술들의 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 경기대학교 산학협력단

【연구기간】 2015.12.18 ~ 2017.12.17

제 4 절. 초고속 PCR법을 이용한 벌집꼬마밑빠진벌레의 검출 방법

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 경기대학교 산학협력단

【특허고객번호】 2-2005-016990-7

【대리인】

【명칭】 특허법인신지

【대리인번호】 9-2010-100061-8

【지정된변리사】 박진석, 이헌수, 유경열, 문호지

【포괄위임등록번호】 2016-017078-4

【발명의 국문명칭】 초고속 PCR법을 이용한 벌집꼬마밑빠진벌레의 검출 방법

【발명의 영문명칭】 Method for detecting a Small Hive Beetle using ultra-rapid Polymerase Chain Reaction technique

【발명자】

【성명】 윤병수

【성명의 영문표기】 Yoon Byoung Su

【발명자】

【성명】 김정민

【성명의 영문표기】 Kim Jung Min

【발명자】

【성명】 임수진

【성명의 영문표기】 Lim Su Jin

【발명자】

【성명】 김병희

【성명의 영문표기】 Kim Byoung Hee

【발명자】

【성명】 김소민

【성명의 영문표기】 Kim So Min

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【공지예외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 학술지 발표(한국양봉학회)

【공개일자】 2017.06.30

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1545013744

【부처명】 농림축산식품부

【연구관리 전문기관】 농림수산식품기술기획평가원

【연구사업명】 수출전략기술개발

【연구과제명】 뒤영벌의 보건안전 및 생물학적 검역방법 설정을 위한 뒤영벌 소재 병원체
검출 및 검량기법의 개발

【기여율】 1/1

【주관기관】 경기대학교 산학협력단

【연구기간】 2015.12.18 ~ 2017.12.17

제 12 장. 참고문헌

코드번호	D-14
<p>강민희, 김일욱, 유미선, 권순환, 윤병수. 2008. 꿀벌 (<i>Apis mellifera</i> L.) 에서 Israeli Acute Paralysis Virus (IAPV) 진단을 위한 PCR 법의 개발. <i>Journal of Apiculture</i>, 23(1): 29-36.</p>	
<p>김원태, 최지영, 김종길, 황석조, 최영철, 한상미, 김미애, 이대원, 윤형주. 2008. 서양뒤영벌(<i>Bombus terrestris</i>)과 호박벌(<i>B.ignitus</i>)에 대한 병원성 세균 분리. <i>Journal of Apiculture</i> 23: 13-20.</p>	
<p>김정민, 임수진, Truong A Tai, 홍기정, 윤병수. 2017. 초고속 유전자 증폭법을 이용한 벌집꼬마밑빠진벌레(<i>Aethina tumida</i>)의 신속한 검출 기법 개발. <i>Journal of Apiculture</i> 32(2): 119-131.</p>	
<p>남성희, 윤형주, 김삼은. 2003. 호박벌(<i>Bombus ignitus</i>)에서 분리된 석고병균, <i>Aspergillus flavus</i> Link 의 형태학적 특성. <i>Journal of Apiculture</i> 18: 43-48.</p>	
<p>민상현, 김정민, 임수진, 김병희, 이철우, 윤병수. 2017. 뒤영벌 병원체 11 종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법 개발. <i>Journal of Apiculture</i> 32(2): 99-109.</p>	
<p>민상현, 왕지희, 임수진, 이철우, 윤병수. 2016. 초고속 역전사 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 한국산 낭충봉아부패병 바이러스의 가장 빠른 검출법. <i>Journal of Apiculture</i> 31(2): 121-131.</p>	
<p>왕지희, 민상현, 임수진, 윤병수. 2016. 꿀벌의 석고병, 백묵병 현장 진단을 위한 신속 <i>Ascospaera apis</i> 및 <i>Aspergillus flavus</i> 검출법 개발. <i>Journal of Apiculture</i> 31(1): 31-39.</p>	
<p>왕지희, 이도부, 구수진, 백문철, 민상현, 임수진, 이철우, 윤병수. 2016b. 다중 PCR 증폭과 특이 DNA-chip 을 활용한 꿀벌 주요 11 종 병원체의 검출법 개발. <i>Journal of Apiculture</i>, 31(2): 133-146.</p>	
<p>유미선, 김동수, 김일욱, 권순환, 윤병수. 2009. Israel Acute Paralysis Virus 의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. <i>Journal of Apiculture</i>, 24(1): 31-36.</p>	
<p>유미선, 김을환, 강민희, 한상훈, 권순환, 윤병수. 2007. 국내 양봉장에서 Kashmir Bee Virus (KBV) 의 검출과 이의 분자생물학적 고찰. <i>Journal of Apiculture</i>, 22(1): 33-42.</p>	

유미선, 김일욱, 강민희, 한상훈, 윤병수. 2008a. Black Queen Cell Virus 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. *Journal of Apiculture*, 23(1): 37-42.

유미선, 김일욱, 강민희, 한상훈, 윤병수. 2008b. Kashmir Bee Virus 와 Israel Acute Paralysis Virus 의 동시 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. *Journal of Apiculture*, 23(2): 97-102.

유미선, 최용수, 박용하, 윤병수. 2010. Chronic Bee Paralysis Virus 의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. *Journal of Apiculture*, 25(1): 31-37.

유미선, 윤병수. 2009. 2009 년 국내 꿀벌 질병의 발생 빈도. *Journal of Apiculture*, 24(4): 273-278.

윤병수. 2017. 꿀벌 질병 방역관리 방안; 낭충봉아부패병 및 SHB 감염증에 대한 대책. 농림축산식품부 (보고서). 등록번호 11-1543000-001739-01. 20-21.

윤형주, 김삼은, 이경용, 이상범, 박인균. 2008. 온도처리에 따른 뒤영벌 일벌과 여왕벌의 생산 효과, *J, Apiculture*, 23 (4): 283-287.

이주성, 루용티홍장, 윤병수. 2015. 꿀벌 병원성 바이러스 Deformed Wing Virus 의 4 종 특이 단백질들의 대량 생산. *한국양봉학회지* 30: 359-372.

이보람, 유미선, Nguyen Van Phu, 노지나, 윤병수. 2011. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 법을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis* 의 검출법 개발. *한국양봉학회지* 26: 103-111.

이혜민, 하정순, 조용호, 남성희, 윤병수. 2004. 꿀벌 진균성 질병의 신속 확인을 위한 *Ascospheara apis*, *Aspergillus flavus* 의 PCR 검출법. *한국양봉학회지* 19: 139-148.

이혜민, 이도부, 한상훈, 남성희, 임윤규, 윤병수. 2005. Real-Time PCR 을 이용한 백목병 원인균 *Ascospheara apis* 의 신속 검출. *한국양봉학회지* 20: 109-116.

이혜민, 유미선, 김을환, 이동우, 한상훈, 윤병수. 2006. 백목병 원인균 *Ascospheara apis* 의 Quick Real-time PCR 검출법. *한국양봉학회지* 21: 107-112.

임수진, Giang Thi Huong Luong, 민상현, 왕지희, 윤병수. 2016. 역전사 실시간 Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA)에 의한 꿀벌 Black Queen Cell Virus 의 신속 검출. 한국양봉학회지 31: 41-50.

임수진, 김정민, 이철우, 윤병수. 2017. 꿀벌 6종 주요 병원체에 대한 초고속 다중 PCR 검출법의 개발. Journal of Apiculture 32(1): 27-39.

정년기. 2013. 학술 4 - 꿀벌에 해로운 동물들 - 1. Journal of the Korean Veterinary Medical Association, Vol. 49 No. 2 : 116 - 122

최용수, 김혜경, 이명렬, 이만영, 이광길. 2008. Minus-strand-specific RT-PCR 에 의한 Chronic Bee Paralysis Virus(CBPV) 진단. 한국양봉학회지 23: 119-126.

최용수, 이명렬, 이만영, 김혜경, 이광길, 이경용, 윤형주. 2009. 국내 최초 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에서의 Deformed Wing Virus (DWV) 진단. Journal of Apiculture 24(1): 23-30.

최용수, 이만영, 홍인표, 김남숙, 김혜경, 변규호, 윤형주. 2010. 뒤영벌류(*Bombus terrestris* 와 *Bombus ignitus*)에서 꿀벌바이러스 진단. Journal of Apiculture 25(4): 259-266.

하정순, 이혜민, 김동수, 임운규, 윤병수. 2005. 유럽부저병(European Foulbrood)의 신속 확인을 위한 *Melissococcus Pluton* 의 PCR Detection Method. 한국양봉학회지 20: 9-18.

Adl, S. M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protists. J. Eukaryot Microbiol., 52 : 399-451.

Ahmed, I., A. Yokota., A. Yamazoe., T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 57: 1117-1125.

Allen, M. and Ball, B. V. 1995. Characterization and serological relationship of strain of kashmir bee virus. Ann. Appl. Biol., 126: 471-484.

- Allen, M., & Ball, B. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee world*, 77(3), 141-162.
- Anderson, D. L., 1984. A comparison of serological techniques for detecting and identifying honeybee viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 44: 233-243.
- Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. *Ann. Rev. Entomol.* 13:191-212.
- Bailey, L. 1975. Recent research on honey bee viruses. *Bee World.* 56: 55-64.
- Bailey, L., A.J. Gibbs, R.D. Woods. 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera Linnaeus*). *Virology*, 21: 390-395.
- Bailey, L. and B.V. Ball. 1991. *Honey Bee Pathology*. Academic Press, London.
- Bailey, L., R. D. Woods, 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bee. *J. Gen. Virol.* 25: 175-186
- Bailey, L. 1967. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascospaera apis* for larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Pathology and Microbial Control.* 162-167.
- Bailey, L. 1967. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus *Ascospaera apis* for larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Pathology and Microbial Control*, North Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands 162-167.
- Bailey, L., 1976. Viruses attacking the honey bee. *Adv. Virus Res.*, 20: 271-304.
- Benda N. D., D. Boucias, B. Torto and P. Teal. 2008. Detection and characterization of *Kodamaea ohmeri* associated with small hive beetle *Aethina tumida* infesting honey bee hive. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47 (3) : 194 - 201
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Nowotny, N., 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 2414 - 2420.

Bernard, P. S., Pritham, G. H., Wittwer, C. T., 1999. Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem*, 273: 221-228.

Bu, R., Sathiapalan, R. K., Ibrahim, M. M., Al-Mohsen, I., Almodavar, E., Gutierrez, M. I., and Bhatia, K. 2005. Monochrome Light Cycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. medical microbiology*. 54: 243-248.

Carletto, J., Gauthier, A., Regnault, J., Blanchard, P., Schurr, F., Ribière-Chabert, M. 2010. Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *EuroReference*, 4: ER04-10R02.

Chamberlain J. S., Gibbs R. A., Ranier J. E., Nguyen P. N., Caskey C. T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Research*, 16: 11141 - 11156.

Chen, Y. P. and Siede, R., 2007. Honey bee viruses. *Adv. Virus Res.* 70: 33 - 80.

Cho, Y.K., J.T. Kim, Y.S. Lee, Y.A. Kim, K. Namkoong, H.K. Lim, K.W. Oh, Sh.H. Kim, J.I. Han, C.S. Pak, C.S. Ki, J.R. Choi, H.K. Myeong, C. Ko. 2006. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. *Biosens. Bioelectron.* 21: 2161-2169.

Choe, S. E., Nguyen, L. T., Noh, J. H., Kweon, C. H., Reddy, K. E., Koh, H. B., Chang, K. Y., Kang, S. W. 2012. Analysis of the complete genome sequence of two Korean sacbrood viruses in the Honey bee, *Apis mellifera*. *Virology*, 432: 155-161.

Choi, Y. S., Kim, H. K., Lee, M. L., Lee, M. Y., Lee. K. G. 2008. Detection of Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) by Minus-strand-specific RT-PCR. *Kor. J. Apicul.*, 23: 119-126.

Choi, Y.S., M.Y. Lee, I.P. Hong, N.S. Kim, H.K. Kim, K.G.Lee and M.L. Lee. 2010. Occurrence of Sacbrood Virus in Korean Apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Kor. J. Apicul.* 25: 187-191.

Cox-Foster, D. L., Conlan, S., Holmes, E. C., Palacios, G., Evans, J. D., Moran, N. A., ... & Martinson, V. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848), 283-287.

Dafni, A. 1998. The threat of *Bombus terrestris* spread. *Bee World*. 79: 113-114

Deans, A. S. C. 1940. Chalk brood. *Bee World*. 21: 46-51.

De Jong D. 1977. A study of chalk brood disease of honey bee. Cornell University, Ithaca, USA, M. Sc. Thersis.

DeRisi, J. L., Iyer, V. R., Brown, P. O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278: 680 - 686.

Dino, P. M., M. A. Furst, J. Caspar, P. Theodorou, M. J. F. Brown and R. J. Paxton. 2015. A sting in the spit: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees, *Journal of Animal Ecology*. 84: 615-624.

Ellis, J. D., & Munn, P. A. 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee world*, 86(4), 88-101.

Euler, M., Wang, Y., Nentwich, O., Piepenburg, O., Hufert, F. T., & Weidmann, M. 2012. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *Journal of Clinical Virology*, 54(4), 308-312.

Euler, M., Wang, Y., Otto, P., Tomaso, H., Escudero, R., Anda, P., ... & Weidmann, M. 2012. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *Journal of clinical microbiology*, 50(7), 2234-2238.

Evans J. D., J. S. Pettis and H. Shimanuki. 2000. Mitochondrial DNA Relationships in an Emergent Pest of Honey Bees: *Aethina tumid* (Coleopters: Nitidulidae) From the United States and Africa. *Entomological Society of America* Vol. 93 (3)

Evans J. D., J. S. Pettis, W. M. Hood and H. Shimanuki. 2002. Tracking an invasive honey bee pest : mitochondrial DNA variation in North American small hive beetles. *Apidologie* 34 : 103 - 109

Eyer M., Y. P. Chen., M. O. Schafer, J. Petter and P. Neumann. 2008. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie* 40 : 419 - 428

Ferguson, J. A., Boles, T. C., Adams, C. P., Walt, D. R. 1996. A fiber-optic DNA biosensor microarray for the analysis of gene expression. *Nature Biotechnol*, 14: 1681 - 1684.

Flores, J. M., Ruiz, J. A., Ruz, J. M., Puerta, F., Bustos, M., Padilla, F., Campano, F. 1996. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie*, 27: 185-192.

Fodor, S. P. A., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., Solas D. 1991. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*, 251: 767 - 773.

Fodor, S., Rava, R. P., Huang, X. C., Pease, A. C., Holmes, C. P., Adams, C. L. 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 364: 555 - 556.

Frazer, J. L., K. M. Tham, M. Reid, M. van Andel, A. M. McFadden, E. Forsgren, J. L. Pettis, H. Pharo. 2016. First detection of *Nosema ceranae* in New Zealand honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 54(4): 358-365.

Ghosh, R.C., B.V. Ball, M.M. Willcocks and M.J. Carter. 1999. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picornavirus. *J. Gen. Virol.* 80: 15541-1549.

Giang Thi Huong Luong, Hee-Young Lim, Byoung-Su Yoon. 2014. Over-expression and Purification of RNA Dependent RNA Polymerase from Black queen cell virus in Honeybee. *Kor. J. Apicul.* 29: 173-180.

Giang Thi Huong Luong, Joo-Seong Lee, So-Jung Yong, 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.

Gillespie, D. and Spiegelman, S. 1965. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. molecular biology*, 12: 829-842.

Gisder, S. and Genersch, E. 2015. Identification of candidate agents active against *N. ceranae* infection in honey bees: establishment of a medium throughput screening assay based on *N. ceranae* infected cultured cells. *PloS one*, 10: e0117200.

Grabensteiner, E., Bakonyi, T., Ritter, W., Pechhacker, H., & Nowotny, N. (2007). Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera L.*): Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus and Sacbrood virus. *Journal of invertebrate pathology*, 94(3), 222-225.

Guillermo Hernán Sguazza, Francisco José Reynaldi, Cecilia Mónica Galosi, Marcelo Ricardo Pecoraro. 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J. virological methods* 194.1: 102-106.

Hee-Young Lim, and Byoung-Su Yoon. 2013. Rapid and Sensitive detection of Deformed Wing Virus (DWV) in Honeybee using Ultra-rapid Real-time PCR. *Kor. J. Apicul.* 28: 121-129.

Ha, J. S., Lee, H. M., Kim, D. S., Lim, Y. K., Yoon, B. S. 2005. A PCR detection method of *Melissococcus Pluton* for rapid identification of European Foulbrood. *Kor. J. Apicul.*, 20: 9-18.

Han, S. H., Choi, Y. S., Lee, M. L. 2011. Development of highly specific quantitative Real-Time PCR method for the detection of Sacbrood virus in Korean Honeybees, *Apis cerana*. *Kor. J. Apicul.*, 26: 233-240.

Han, S.H., D.B. Lee, D.W. Lee, E.H. Kim and B.S. Yoon. 2008. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *J. Invertebr. Pathol.* 99: 8-13.

Han, S .H., Y. S. Choi and M. L. Lee. 2011. Development of Highly Specific Quantitative Real-Time PCR Method for the Detection of Sacbrood Virus in Korean Honeybees, *Apis cerana*. *J. Apiculture* 26(3): 233 - 240.

Harris L. D., Griffith J. D. 1988. Formation of D loops by the UvsX protein of T4 bacteriophage: A comparison of the reaction catalyzed in the presence or absence of gene 32 protein. *Biochemistry*, 27: 6954 - 6959.

Hee-Young Lim. 2013. Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra-Fast High-Performance PCR (UF-HP PCR). *J. Apiculture*. 28: 237-244.

Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11 : 1026-1030.

J. Carletto, A. Gauthier, J. Regnault, P. Blanchard, F. Schurr, M. Ribière-Chabert. 2010. Detection of main honey bee pathogens by multiplex PCR. *EuroReference*, No. 4, ER04-10R02.

Ji Lian Lia, R. Scott Cornmanb, Jay D. Evansb, Jeffery S. Pettisb, Yan Zhaoc, Charles Murphyd, Wen Jun Penga, Jie Wua, Michele Hamiltonb, Humberto F. Boncristiani Jr.e, Liang Zhouf, John Hammondg, and Yan Ping Chenb. 2014. Systemic spread and propagation of a plant-pathogenic virus in European honeybees, *Apis mellifera*. *MBio* 5: e00898-13.

Joo-Seong Lee, Giang Thi Huong Luong, and Byoung-Su Yoon. 2016. Development of in-field-diagnosis of *Aspergillus flavus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Honeybee. *Kor. J. Apicul.* 31: 25-30.

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. *Kor. J. Apicul.* 30: 53-59.

Jung, C. E. 2008. Economic value of honeybee pollination on major fruit and vegetable crops in Korea. *Korean Journal of Apiculture*. 23(2): 147 - 152.

Kafatos, F. C., Jones, C. W., Efstratiadis, A. 1979. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1541 - 1552.

Kang, M.H., I.W. Kim, D.W. Lee, M.S. Yoo, S.H. Han, B.S. Yoon. 2011. Development of a rapid detection method to detect *tdh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* using 2-step ultrarapid real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69: 21-29.

Kang, S. W., Yoo, M. S., Noh, J. H., Park, H. S., Jeon, D. M., Park, S. C., ... & Lee, M. K. 2012. Occurrence and Prevalence of Honeybee Disease in *Apis mellifera* and *Apis cerana* in Korea. *Journal of Apiculture*, 27(3), 187-195.

Kersting, S., Rausch, V., Bier, F. F., von Nickisch-Rosenegk, M. 2014. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malaria journal*, 13: 1-8.

Kim Cuc Nguyen Thi, Mi-Sun Yoo, Il-Wook Kim, Min-Hee Kang, Sang-Hoon Han and Byoung-Su Yoon. 2008. Development of PCR Detection Method for Sacbrood Virus in Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Kor. J. Apicul.* 23: 177-184.

Kim I.W., M.H. Kang, S.H. Kwon, S.H. Cho, B.S. Yoo, S.H. Han, B.S. Yoon. 2010. Rapid detecton of virulence *stx2* gene of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* using two-step ultra-rapid real-time PCR. *Biotechnology Letters*. 32:681-688.

Kim J.Y., Lee J.L., 2016. Rapid detection of salmonella enterica serovar enteritidis from eggs and chicken meat by real-time recombinase polymerase amplification in comparison with the two-step real-time PCR. *Journal of Food Safety*. doi: 10.1111/jfs.12261

Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. 2008. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of virological methods*, 147(2), 275-281.

Leat, N., Ball, B., Govan, V., & Davison, S. 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen-cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *Journal of General Virology*, 81(8), 2111-2119.

Lee, B. R., Yoo, M. S., Van Nguyen, P., No, J. N., Yoon, B. S. 2011. Development of method for the detection of *Ascospaera apis* by loop-mediated isothermal amplification. *Kor. J. Apicul.*, 26: 103-111.

Lee, D.W., E.H. Kim, I.U. Kim, Yoo M.S., Yoon BS. 2007. Ultra-rapid two-step real-time PCR for the detection of human immunodeficiency virus(HIV). *Kor J Microbiol.* 43:264-272.

Lee, H. M., Ha, J. S., Jo, Y. H., Nam, S. H, Yoon, B. S. 2004. PCR detection method of *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus* for rapid identification of fungal disease in honeybee. *Kor. J. Apicul.*, 19: 139-148.

Lee, H. M., Ha, J. S., Jo, Y. H., Nam, S. H, Yoon, B. S. 2004. PCR detection method of *Ascospaera apis*, *Aspergillus flavus* for rapid identification of fungal disease in honeybee. *Kor. J. Apicul.*, 19: 139-148.

Lee, H. M., Yoo, M. S., Kim, E. H., Lee, D. H., Han, S. H., Yoon, B. S. 2006. Rapid detection of *Ascospaera apis* causing Chalkbrood disease by using quick Real-Time PCR. *Kor. J. Apicul.*, 21: 107-112.

Lee, J. S., Lim, H. Y., Yoon B. S. 2013. Development of specific detection method for fungal pathogens in honeybee by loop-mediated isothermal amplification. *J. Apicul.*, 28 : 245-250.

Lee, J. S., Luong, GTH., Yoon B. S. 2015. Mass-production of four specific proteins originated from deformed wing virus, honeybee-viral pathogen. *Kor. J. Apicul.*, 30: 359-372

Lee, J. S., S. J. Yong, H. Y. Lim, B. S. 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.

- Lee, J. S., G. T. H. Luong, B. S. Yoon. 2016. Development of in-field-diagnosis of *Aspergillus flavus* by Loop-Mediated Isothermal Amplification in Honeybee. *Journal of Apiculture*, 31(1): 25-30.
- Lee, S., Hong, K. J., Cho, Y. S., Choi, Y. S., Yoo, M. S., & Lee, S. 2017. Review of the subgenus *Aethina* Erichson s. str.(Coleoptera: Nitidulidae: Nitidulinae) in Korea, reporting recent invasion of small hive beetle, *Aethina tumida*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 553-558.
- Lennon, G. G. and Lehrach, H. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends in Genetics*, 7: 314 - 317.
- Li, Yongjin. 2016. Establishment and Application of a Visual DNA Microarray for the Detection of Food-borne Pathogens. *J. Analytical Sciences* 32.2: 215-218.
- Lin, Y. J., Chang, Y. C., Hsiao, N. W., Hsieh, J. L., Wang, C. Y., Kung, S. H., Tsai, F. J., Lan, Y. C., Lin, C. W. 2012. Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71. *J. virological methods*, 182: 93-98.
- Lim, H. Y. 2013. Development of Novel Rapid Detection Method for Deformed Wing Virus (DWV) using Ultra-Fast High-Performance PCR (UF-HP PCR). *Journal of Apiculture*, 28(4): 237-244.
- Lim, H. Y and B. S. Yoon. 2013. Rapid and Sensitive detection of Deformed Wing Virus (DWV) in Honeybee using Ultra-rapid Real-time PCR. *Journal of Apiculture*, 28(2): 121-129.
- Lim, H. Y., S. J. Yong, J. G. Lee, M. J. Ji, O. M. Lee, B. S. Yoon. 2014. Development of Specific PCR Method for Detection of *Nosema apis* Based on Nucleotide Sequence. *Journal of Apiculture*, 29(1): 27-33.
- Luong, G. T. H., J. S. Lee, S. J. Yong, B. S. 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.

Luong, GTH., Lim, H. Y., Yoon B. S. 2014. Over-expression and purification of RNA dependent RNA polymerase from black queen cell virus in honeybee. *Kor. J. Apicul.*, 29: 173-180.

Luong, GTH. and Yoon, B. S. 2015. Over-expression and Purification of Recombinant 3C-like Protease from Black Queen Cell Virus in *Escherichia coli*. *Kor. J. Apicul.*, 30: 45-52.

Ma M., Ma C., Li M., Wang S., Yang S., Wang S. 2011. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. *J. Virol.* 115-119.

Maassen, A. 1913. Weitere Mitteilungen uber der seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen. Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt fur Land-und Forstwirtschaft, 14: 48-58.

Mariano Higes, Raquel Martín-Hernández, Cristina Botías, Encarna Garrido Bailón, Amelia V. González-Porto, Laura Barrios, M. Jesús del Nozal, José L. Bernal, Juan J. Jiménez, Pilar García Palencia, Aránzazu Meana. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology.* 10: 2659 - 2669.

Mansy, F., Brancart, F., Liesnard, C., Bollen, A., God froid, F. 1999. A PCR based DNA hybridization capture system for the detection of human cytomegalovirus. A comparative study with other identification methods. *J. Virol. Methods.*, 80: 113-122.

Masahiro, M. 2000. Pollination of crops with bumblebee colonies in Japan. *Honeybee Sci.* 2: 17-25.

Mayo, M. A. 2002. Virus taxonomy-Houston 2002. *Archives of virology*, 147(5), 1071-1076.

McMenamin, A. J., and Genersch, E. 2015. Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8: 121-129.

- Meysam Sarshar, Nader Shahrokhi, Reza Ranjbar, and Caterina Mammina. 2015. Simultaneous Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* by Oligonucleotide Microarray. *International Journal of Enteric Pathogens* 3: e30187.
- Michael, K. L., Taylor, L. C., Schultz, S. L., Walt, D. R. 1998. Randomly ordered addressable high-density optical sensor arrays. *Anal. Chem.*, 70: 1242 - 1248.
- Min, S. H., J. H. Wang, S. J. Lim, C. W. Lee and B. S. Yoon. 2016. Development of Quantitative Real-time Recombinase Polymerase Amplification (qRT-RPA) Method for Quantitative Detection against Pathogenic Virus in Honeybee (Korean). *Journal of Apiculture*, 31 (2): 147-156
- Mi-Sun Yoo, Hyun-Ji Seo, Ha-Na Jung, WooRam Bae, Hee-Soo Lee, Seung-Won Kang and YunSang Cho. 2014. Center for Honeybee Disease Control. Korea.
- Mi-Sun Yoo, Kim Cuc Nguyen Thi, Phu Van Nguyen, Sang-Hoon Han, Soon-Hwan Kwon, Byoung-Su Yoon. 2012. Rapid detection of sacbrood virus in honeybee using ultra-rapid real-time polymerase chain reaction. *J. Virological Methods* 179: 195-200.
- Mi-Sun Yoo, Sang-Hoon Han, and Byoung-Su Yoon. 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus. *Kor. J. Apicul.* 26: 203-208.
- Nazarenko, I. A., S. K. Bhatnagar, and R. J. Hohman. 1997. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Research* 25(12): 2516-2521.
- Nguyen, C., Rocha, D., Granjeaud, S., Baldit, M., Bernard, K., Naquet, P., Jordan, B. R. 1995. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*, 29: 207 - 216.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., Fodor, S. P. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc. Natl Acad. Sci., USA* 91: 5022 - 5026.

- Piepenburg, O. Williams. Colin H, Stemple, Derek L. Armes, Niall A. 2006. DNA Detection Using Recombination Proteins, *PLoS Biol*, 4(7): 1115-1121.
- Priest, F. G., M. Goodfellow and C. Todd. 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology*. 134: 1847-1882.
- Puerta, F., Flores, J. M., Bustos, M., Padilla, F., and Campano, F. 1994. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie*, 25: 540-546.
- Rinderer, T. E., and Green, T. J. 1976. Serological relationship between chronic bee paralysis virus and the virus causing hairless-black syndrome in the honeybee. *J. Invertebrate Pathology*, 27: 403-405.
- Ririe, K. M. Rasmussen, R. P. Wittwer, C. T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Bioche.*, 245: 154-160.
- Roetschi, A., H. Berthoud, R. Kuhn, A. Imdorf. 2008. Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39(3): 362-371.
- Rong Bu, Rajeev K. Sathiapalan, Muna M. Ibrahim, Ibrahim Al-Mohsen, Edna Almodavar, Marina I. Gutierrez and Kishor Bhatia. 2005. Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*. *J. Medical Microbiology* 54: 243-248.
- Ruijter, A. D. 1996. Commercial bumblebee rearing and its implications. In: Richards KW (ed) *Proceedings of the 7th international symposium on pollination*. ISHS Acta Horticulturae Belgium. 437: 261-269
- Runckel, C., Flenniken, M. L., Engel, J. C., Ruby, J. G., Ganem, D., Andino, R., and DeRisi, J. L. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLOS one* 6: e20656.

Sang-Hoon Han, Do-Bu Lee, Dong-Woo Lee, Eul-Hwan Kim, Byoung-Su Yoon. 2008. Ultra-rapid real-time PCR for the detection of *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American Foulbrood (AFB). *J. Invertebrate Pathology* 99: 8-13.

Sang-Hoon Han, Yong-Soo Choi, Myeong-Lyeol Lee. 2011. Development of Highly Specific Quantative Real-Time PCR Method for the Detection of Sacbrood Virus in Korean Honeybees, *Apis cerana*. *Kor. J. Apicul.* 26: 233-240.

Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Puchades, R., Maquieira, A. 2014. Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis. *Analytica chimica acta*, 811: 81-87.

Santiago-Felipe, S., Tortajada-Genaro, L. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, Á. 2014. One-pot isothermal DNA amplification - Hybridisation and detection by a disc-based method. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204: 273-281.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., Brown, P. O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270: 467 - 470.

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.

Sekiguchi, H., Isogai, M., Masuta, C., Uyeda, I. 2005. 3C-like protease encoded by Rice tungro spherical virus is autocatalytically processed. *Archives of Virology*, 150 : 595-601

Sguazza, G. H., Reynaldi, F. J., Galosi, C. M., Pecoraro, M. R. 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J. Virological Methods*, 194.1: 102-106.

Shalon, D., Smith, S. J., Brown, P. O. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.*, 6: 639 - 645.

Shan, Y., Xia, H., Dong, C., Cheng, Z., Xia, X., Zhang, J., Zhou, X and Hu, Y. 2012. Identification and characterization of Iflavirus 3C-like protease processing activities. *Virology*, 428: 136-145.

Smith, E. C. 1993. Inoculation Experiments with *Bacillus fusiformis* isolated from Tropical Ulcer with Observations on the Bacillus. *Epidemiology and infection*. 33: 95-102.

Song, K. S., Nimse, S. B., Kim, H. J., Yang, J., & Kim, T. 2016. Accurate Detection of Rifampicin-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Strains. *Sensors*, 16: 376.

Southern, E. M., U. Maskos, and J. K. Elder. 1992. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* 13: 1008-1017.

Southern, E. M., Case-Green, S. C., Elder, J. K., Johnson, M., Mir, K. U., Wang, L., Williams, J. C. 1994. Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 22: 1368-1373.

Southwick, E. E., and Southwick, L. 1992. Estimating the economic value of honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) as agricultural pollinators in the United States. *J. Economic Entomology*, 85: 621-633.

Stoltz, D., Shen, X. R., Boggis, C., Sisson, G., 1995. Molecular diagnosis of kashmir bee virus infection. *J. Api. Res.*, 34: 153-160.

Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., & Bergoin, M. (2004). Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and environmental microbiology*, 70(12), 7185-7191.

Thi, K. C. N., Yoo, M. S., Kim, I. W., Kang, M. H., Han, S. H., Yoon B. S. 2008. Development of PCR detection method for sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Kor. J. Apicul.*, 23: 177-184.

Thi, K. C. N., Yoo, M. S., Kim, I. W., Kang, M. H., Han, S. H., Yoon B. S. 2008. Development of PCR detection method for sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera* L.). *Kor. J. Apicul.*, 23: 177-184.

Thole V, Hull R. 1998. Rice Tungro Spherical Virus Polyprotein Processing: Identification of a Virus-Encoded Protease and Mutational Analysis of Putative Cleavage Sites. *Virology*, 247 : 106-114

Thomas, M. C. 1998. Florida pest alert - the small hive beetle. *American bee journal* Vol. 138 No. 8 : 565

Van Nguyen, P., J. N. No, S. H. Han, S. H. Kwon, Y. H. Park, B. S. Yoon. 2010. Development of Sacbrood Virus-specific PCR detection based on stable Capsid Protein Sequence. *Journal of Apiculture*, 25(2): 115-122.

Van Nguyen, P., B. R. Lee, M. S. Yoo, B. S. Yoon. 2012. Development and Clinical Validation of a DNA Gyrase Subunit B Gene Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of *Melissococcus plutonius*. *Journal of Apiculture*, 27(1): 51-58.

Velthuis, H. H. W, and A. Van Doorn. 2006. A century of advances in bumble bee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*. 37: 421-451.

Walt, D. R. 2000. Bead-based fiber-optic arrays. *Science*, 287: 451.

Wang. J. H., D. B. Lee., S. J. Ku., M. C. Peak., S. H. Min., S. J. Lim., C. W. Lee. and B. S. Yoon. 2016. Development of a Detection Method against 11 Major Pathogens of Honey Bee using Amplification of Multiplex PCR and Specific DNA-chip (Korean). *Journal of Apiculture* 31(2): 133-146.

Wang, J., Y. Fan and Z. Yao. 2010. Isolation of a *Lysinibacillus fusiformis* strain with tetrodotoxin-producing ability from puffer fish *Fugu obscurus* and the characterization of this strain. *Toxicon*. 56: 640-643.

Ward L., M. Brown, P. Neumann, S. Wilkins, J. Pettis and N. Boonham. 2007. A DNA method for screening hive debris for the presence of small hive beetle (*Aethina tumida*). *Apidologie* 38 : 1 - 9

Wilkins, S., M. A. Brown, A. G. Cuthbertson. 2007. The incidence of honey bee pests and diseases in England and Wales. *Pest management science*, 63(11): 1062-1068.

Woo, K.S and J.H. Lee. 1999. *Beekeeping Management*; V. Honeybee and Pollination. 3rd Edition. Seoul National University Press.

Xia, X., Yu, Y., Weidmann, M., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. 2014. Rapid detection of shrimp white spot syndrome virus by real time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *PloS one*, 9(8), e104667.

Yan Ping Chen, and Reinhold Siede. 2007. Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research* 70: 33-80.

Yang, X., D. L. Cox-Foster. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(21): 7470 - 7475

Yang, X. and Cox-Foster, D. L. 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *PNAS* 21: 7470 - 7475

Yang, Y., Qin, X., Wang, G., Zhang, Y., Shang, Y., & Zhang, Z. 2015. Development of a fluorescent probe-based recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Orf virus. *Virology journal*, 12(1): 206.

Yoo, M.S., Seo, H. J., Jung, H. N., Bae, W. R., Lee, H. S., Kang S. W., Cho, Y. S. 2014. Center for Honeybee Disease Control. Korea.

Yoo, M. S., Han, S. H., & Yoon, B. S. 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for Detection of Black Queen Cell Virus. *Journal of Apiculture*, 26(3), 203-208.

Yoo, M. S., J. N. No, B. R. Lee, Y. H. Park, B. S. Yoon. 2011. Development of Ultra-Rapid Real-Time PCR Method for the Detection of Nosema. *Journal of Apiculture*, 26(1): 21-27.

Yoo, M. S., Kim, I. W., Kang, M. H., Han, S. H., & Yoon, B. S. 2008. Development of Real-Time PCR Method for Black Queen Cell Virus. *Korean Journal of Apiculture*. 23(1), pp. 37-42.

Yoon, B. S., Han, S. H., Lim, H. Y. 2014. *Manual of method for molecular biology IV*. Kyonggi University, Korea.

Zhang, S., Ravelonandro, M., Russell, P., McOwen, N., Briard, P., Bohannon, S., & Vrient, A. (2014). Rapid diagnostic detection of plum pox virus in Prunus plants by isothermal AmplifyRP® using reverse transcription-recombinase polymerase amplification. *Journal of virological methods*, 207, 114-120.

Zhao, N., Hashida, H., Takahashi, N., Misumi, Y. & Sakaki, Y. 1995. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene*, 156: 207 - 213.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 수출전략기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 수출 전략기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.