

<論 文>

酵素抗體法에 의한 누에 바이러스성 무름病的 診斷

姜錫宇 · 金權榮 · 姜錫權*

農村振興廳 蠶業試驗場, *서울대학교 農業生命科學大學 農業生物 新素材研究센터

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) for the Rapid Detection of the Flacherie Virus Disease

Suk Woo Kang, Keun Young Kim and Seok Kwon Kang*

Sericultural Experiment Station, RDA, Suwon, Korea

*Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was studied for the rapid diagnosis of the flacherie virus (FV) of the silkworm, *Bombyx mori*. The optimised concentration of rabbit anti-FV IgG and enzyme conjugate for the this technique were 15 µg/ml and 1:100 dilution, respectively. In ELISA, the detectable concentration of purified FV was 15 ng/ml, and the flacherie viral antigens in the larval extracts were detected as early as 24 hours after the experimental infection. The results indicated that ELISA technique proved to be applicable for the rapid diagnosis of flacherie virus disease.

Keywords : Silkworm, flacherie virus, diagnosis, ELISA

緒 論

누에 바이러스성 무름病은 국내 養蠶農家에 널리 분포하고 있으며, 傳染性 및 病原性이 強하여 集團 違作을 招來하며 潛伏期間이 길어 주로 上簇直前に 發病한다.

點澤 등(1964)에 의해 양잠위작 농가로부터 최초로 분리된 무름病 바이러스는 27 nm의 球形粒子로 Picornaviridae(科)에 속하며 核酸은 單--가닥의 RNA임이 밝혀졌으며(川瀨 등, 1980), 또한 무름病 바이러스에 感染된 누에는 細菌 및 濃核病 바이러스에 의한 것과 외부 症狀의 구별이 곤란함에 따라(清水, 1975) 본 病 防除을 위한 보다 效果적인 診斷法 개발에 많은 연구가 이루어져 왔다.

從來 바이러스성 무름病 진단법으로 生物 檢定法(點澤, 1964) 및 病理組織學의 方法(岩下, 1965) 등이

개발되었으나 진단 소요시간이 길고 과정이 복잡하여 본 病의 조기진단방법으로 적합하지 못함에 따라 새로운 진단법 개발에 관한 연구가 이루어졌으며 특히, 免疫 血清을 이용한 血清학적 방법들이 시도되어 古田, 清水(1976) 및 古田 등(1976)은 Agar gel을 支持 體로한 2重免疫擴散法으로 본 病의 진단시기를 구명 하였으며, 또한 螢光抗體를 이용한 螢光항체법(井上 · 點澤, 1971), electrosynthesis(秋葉 등, 1978), single radial immunodiffusion(關 · 關島, 1976), Latex 凝集 反應(Shimizu *et al.*, 1983) 등이 보고되고 있으나 낮은 바이러스 檢出 感度 또는 진단과정의 복잡하고 장시간이 소요되는 등 본 病을 단시간에 정밀 진단할 수 있는 方法으로 부적합한 점이 보고되고 있다.

한편 酵素抗體法은 검출 감도가 높고 동시에 다량의 시료를 檢定할 수 있어 의학 및 수의학분야 등에서 미생물 同定 및 질병 진단 수단으로 이용되어 왔으며

(Voller *et al.*, 1979), 곤충바이러스 분야에서는 주로 바이러스 分類·同定(Morris *et al.*, 1981, Brown *et al.*, 1982, Payment *et al.*, 1982) 및 蛋白質 연구(Langridge *et al.*, 1981) 수단으로 사용되어 왔다. 또한 누에병 분야에서도 核多角體病 및 細胞質 多角體病, 微粒子病, 濃核病에 대한 진단연구가 보고되고 있으며(川瀨, 1990, 福原·綠川, 1981, Kawarabata·Hayasaka, 1987), 清水(1982)는 효소항체법으로 무름병 바이러스 검출감도를 조사한 결과 3 ng/ml까지 검출가능하였으며 이는 생물 검정법의 검출감도와 비슷한 수준이며 2중면역확산법보다 6,000배, Latex 응집 반응보다 200배 높다고 하였다.

본 연구는 현재 국내 양잠 농가로부터 무름병 바이러스를 분리하였으나 본 병에 의한 피해상황 및 효과적인 방제법이 수립되어 있지 않은 실정에서 稚蠶共同 飼育場에서 배부되는 애누에에 대한 감염여부검정 및 대규모 양잠농가의 사육 중에 早期診斷할 수 있고 또한 사육 환경내 미량 오염 바이러스를 검정할 수 있는 진단법을 개발하고자 효소항체법에 의한 무름병 바이러스 검출감도 및 이병잡 진단가능성을 조사·분석하였다.

材料 및 方法

1. 바이러스 精製 및 罹病蠶 採取

무름병 바이러스는 1989년 경기도 향남의 양잠농가에서 발생한 무름병잠으로부터 분리한 것을 사용하였으며 바이러스 증식은 이병잡 中腸 무게의 10배량의 증류수를 가하여 5분간 마쇄한 후 8,000 rpm에 30분간 원심하여 상층액을 원액으로 하여 10^{-2} 농도로 희석한 후 4령 기잡에 경구 접종하여 전형적인 무름병 증상을 나타내는 병잠의 중장을 채취하여 -70°C 에 보관하면서 바이러스 분리 정제에 사용하였다.

바이러스 분리정제는 金·姜(1984)의 방법에 따라 10~40% 蔗糖密度勾配遠心分離하여 정제한 바이러스를 얻어 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

바이러스 접종 후 검출시기를 조사하고자 10^{-2} 농도의 바이러스 接種液을 뽕잎에 塗抹 및 陰乾하여 2령 기잡에 添食시킨 후 24시간 간격으로 채취하여 -20°C 에 보관하면서 시험에 供試하였다.

2. IgG 分離·精製

무름병 바이러스에 대한 抗血清은 金 等(1991)에 의해 토끼에서 생산한 것을 사용하였으며, 순수 정제된 IgG를 얻고자 Ammonium sulfate 침전을 2회 반복한 후 얻은 침전물을 소량의 0.07 M phosphate

buffer(pH 6.3)에 희석한 후 이것을 DEAE-cellulose (fine mesh sigma) gel을 지지체로 하여 ion chromatography법으로 280 nm에서 흡광도를 측정하면서 5 ml씩 분획하였다. 分劃한 IgG를 PBS에 24시간 dialysis한 후 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

3. Enzyme-linked immunosorbent의 調製

분리·정제한 IgG(1 mg/ml)에 Horseradish peroxidase(sigma Type vi RZ 2.9)를 반응시켜 HRP conjugate를 얻고자 Tijssen & Kurstak(1984)의 방법에 따라 1 mg의 Horseradish peroxidase를 1 ml의 0.1 M carbonate buffer(pH 9.2)에 용해시킨 후 1 ml의 NaIO_4 용액으로 활성화시켰으며 이러한 용액을 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)에 dialysis한 후 4 ml의 IgG와 1 mg의 sephadex G-25(fine mesh, sigma)를 첨가하여 3시간 동안 반응시켜 elution하였다. 또한 elution한 conjugate를 NaBH_4 용액으로 안정화시킨 후 포화 ammonium sulfate로 鹽析하고 PBS(pH 7.2)로 dialysis하여 얻은 용액에 동량의 glycerol과 0.02% BSA를 부가한 후 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

4. 酵素抗體法

효소항체법은 清水(1982) 및 Payment *et al.*(1982)의 방법을 수정하여 그림 1과 같은 순서로 수행하였으며 각 단계의 세척은 octapette(costar 100 μl)을

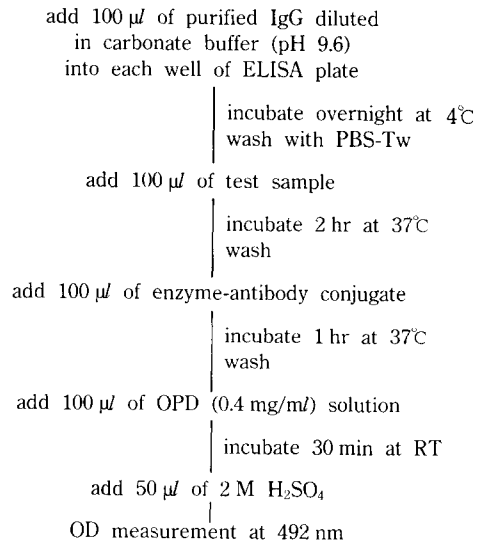


Fig. 1. Procedure of sandwich ELISA for FV detection. Test sample and enzyme-antibody conjugate were prepared in PBS-BSA-Tw, and OPD solution was prepared in 0.05 M phosphate citrate buffer (pH 5.0).

사용하여 5분간 3회 실시하였으며 실험은 2반복으로 하였다.

또한 ELISA의 결과 판정은 건강한 누에 OD值的 2배 이상을 ELISA 陽性으로 하였다.

5. 2重免疫擴散法

2중면역확산법은 Kurihara *et al.*(1984)의 방법에 따라 조제한 1% agarose gel을 사용하였으며, 항원 항체반응은 정제한 무름병 바이러스를 PBS 용액(pH 7.2)으로 희석하여 농도를 조정된 다음 항혈청과 37℃에서 48시간 반응시켰다. 또한 무름병 바이러스 접종 후 24시간 간격으로 채취한 누에를 5배량의 PBS (pH 7.2)를 가하여 유발로 마쇄한 후 위와 같은 방법으로 반응시켜 沈降帶 형성을 관찰하였다.

6. 바이러스 및 IgG 濃度 測定

Lowry *et al.*(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumin(sigma fraction v)을 표준으로 하여 spectrophotometer(LKB Ultrospec II)로 吸光度를 측정한다 다음 농도를 산출하였다.

37℃ 1시간씩 반응한 후 0.1 M citric phosphate 용액 (pH 5.0)에 용해시킨 o-phenylenediamine 용액으로 발색하여 ELISA reader(Molecular Devices UV max)로 492 nm에서 흡광도를 측정한다 결과 표 1과 같은 결과를 얻었다.

표 1에서 보는 바와 같이 IgG의 최적 농도는 15 µg/ml이었고 효소결합항체는 100배 희석액이 적당하여 이후 이와 같은 조건으로 실험을 수행하였다.

2. 무름病 바이러스 檢出感度

재료 및 방법의 그림 1과 같은 순서로 15 µg/ml 농도의 IgG를 immunoplate에 흡착시킨 후 농도별로 조제한 바이러스와 효소결합항체를 반응시킨 결과 15 ng/ml 농도의 바이러스까지 검출 가능하였다(그림 2).

이와 같은 결과는 清水(1982)의 시험 결과 3ng/ml까지 가능했다는 보고보다 검출감도가 낮았으며 이는 본 실험에서 공시 바이러스를 100 µl 사용했다는 것과 본 실험실에서 항체에 결합시킨 peroxidase의 결합정도의 차이라고 생각된다.

結果 및 考察

1. 酵素抗體法の 最適 條件

무름병 바이러스의 검출감도 및 시기를 조사하기 위한 효소항체법의 최적 조건을 구명하고자 96 well elisaplate(flat bottom, corning)에 50 ng/ml 농도의 무름병 바이러스를 37℃ 2시간 동안 부착시켰으며 이어서 농도별로 조제한 IgG 및 효소결합항체를 각각

Table 1. Results of chequerboard titration using IgG and conjugate

Concentration of IgG (µg/ml)	Enzyme conjugate dilution				
	50×	100×	200×	400×	Control ¹⁾
120	0.491	0.466	0.375	0.143	0.034
60	0.433	0.454	0.248	0.129	0.040
30	0.325	0.367	0.215	0.084	0.037
15	0.305	0.305	0.200	0.053	0.042
7.5	0.286	0.180	0.106	0.043	0.039
3.75	0.102	0.083	0.044	0.044	0.045
Control ²⁾	0.043	0.045	0.039	0.047	0.041

*Concentration of FV used was 50 ng/ml.
ELISA values were expressed as absorbancies at 490 nm

¹⁾Control was omitted the enzyme conjugate treatment.

²⁾Control was omitted the IgG treatment.

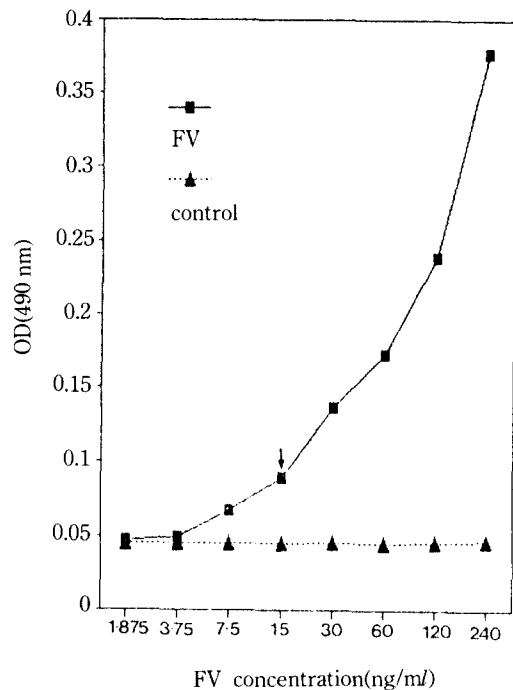


Fig. 2. Relationship between flacherie virus concentration and absorbancies at 490 nm in the sandwich ELISA.

Table 2. Infected periods for the detection of the FV by the ELISA

Hours after FV inoculation	Larval extracts dilution				
	5×	10×	20×	40×	Control ^{b)}
0	0.042	0.051	0.038	0.043	0.045
24	0.086	0.080	0.065	0.052	0.042
48	0.131	0.093	0.080	0.077	0.038
72	0.619	0.411	0.341	0.116	0.047
96	1.047	0.932	0.828	0.629	0.040
120	1.132	0.940	0.979	0.919	0.045

*ELISA values were expressed as absorbancies at 490 nm.

Concentration of IgG and enzyme conjugate used were 15 µg/ml and 1:100 dilution, respectively.

^{b)}Control was healthy larvae extracts.

3. 무름병 바이러스 檢出時期

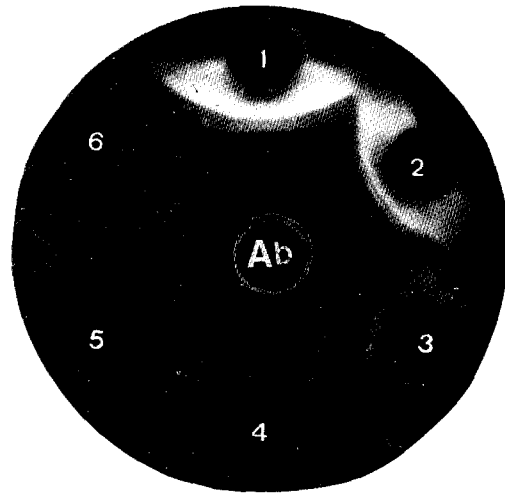
바이러스 접종 후 24시간 간격으로 채취한 누에를 5배량의 PBS에 마쇄하여 원심한 상층액을 5배 부유액으로 하여 10, 20, 40배액을 만들어 바이러스 검출시기를 조사한 결과 표 2와 같은 결과를 얻었다.

표 2에서 보는 바와 같이 건강잠의 5, 10, 20, 40배 마쇄액은 대조보다 다소 높은 비특이 반응이 인정되었으나 희석액간의 차이는 거의 없었다. 또한 바이러스 접종 후 검출시기는 5배 희석액의 경우 24시간째부터 10, 20배액은 48시간, 40배액은 72시간부터 가능한 것으로 판명되었다.

이와 같은 결과는 2중면역확산법으로 2일째부터 바이러스를 검출할 수 있다는 古田·清水(1978)의 보고와 electrosynersis법에 의해 2일부터 가능했다는 秋葉(1978)의 보고보다 조기에 바이러스를 검출할 수 있는 방법이라 생각되며 더우기 96 well을 이용하므로 동시에 다량의 시료를 판독할 수 있어 바이러스성 무름병의 조기진단법으로 이용 가능하다고 생각된다.

4. 2重免疫擴散法과의 比較

정제한 바이러스를 1% agarose gel의 주변 well에 주입하고 중앙에는 항혈청을 넣은 후 항원 항체반응을 한 결과 정제 바이러스 32.5 µg/ml까지 침강대를 형성하였다(그림 3). 이와 같은 결과는 清水(1982)가 보고한 18 µg/ml까지 검출할 수 있다는 보고 보다 다소 낮은 검출감도였으며 또한 바이러스 접종 후 검출시기는 그림 4에서와 같이 48시간부터 가능한 것으로 나타났으며 이와 같은 결과는 古田·清水(1978)가 4령 기잠에 무름병 바이러스를 정량적으로 주



Ab: antiserum against FV

1: 260 µg/ml (FV concentration)

2: 130 µg/ml

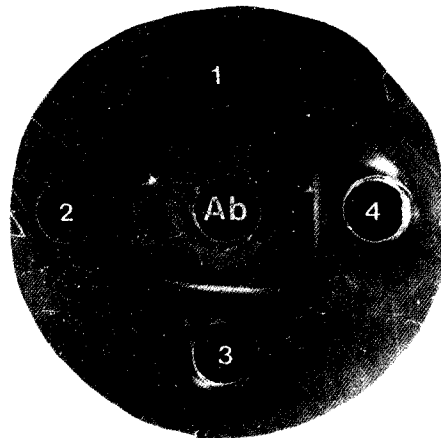
3: 65 µg/ml

4: 32.5 µg/ml

5: 16.25 µg/ml

6: 8.125 µg/ml

Fig. 3. Detectable concentration of purified flacherie virus by the double diffusion test.



Ab: antiserum against FV

1: 24 hours after FV inoculation

2: 48 hrs

3: 72 hrs

4: 96 hrs

Fig. 4. The infected periods for the detection of the flacherie virus in the larval extracts by the double diffusion test.

사한 후 48시간부터 검출 가능했다는 보고와 잘 일치하고 있다.

이와 같이 2중면역확산법은 효소항체법에 의한 무름병 검출감도보다 약 2,100배 정도 낮았으며 검출시기도 다소 늦는 것으로 판명되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 효소항체법에 의한 무름병 바이러스 검출감도는 15 ng/ml까지로 미량의 바이러스를 검출할 수 있었으며 또한 바이러스 접종 후 24시간부터 검출 가능하며 이는 2중면역확산법의 경우보다 검출감도 및 검출시기가 우수하여 바이러스성 무름병의 조기진단법으로 이용가능하다고 생각된다.

摘 要

효소항체법에 의한 바이러스성 무름병의 조기진단 가능성을 구명하고자 무름병 바이러스 검출을 위한 효소항체법의 최적조건을 구명하고, 이와 같은 조건으로 바이러스 검출감도 및 검출시기를 조사 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 효소항체법에 사용되는 항혈청의 농도는 15 µg/ml이 적당하였으며, 효소결합 항체는 100배 희석액이 적당하였다.

2. 효소항체법에 의한 무름병 바이러스의 최소 검출농도는 15 ng/ml이었고, 2중면역확산법의 32.5 µg/ml보다 약 2,100배 정도 검출감도가 높았다.

3. 무름병 바이러스 접종 후 바이러스 검출시기는 효소항체법의 경우 24시간째로 2중면역확산법의 48시간보다 초기에 검출 가능하였다.

4. 이상의 결과를 종합해 볼 때 바이러스성 무름병의 조기진단법으로 바이러스 검출감도가 높고 농시에 다량의 시료를 검정할 수 있는 효소항체법이 가능한 것으로 판명되었다.

引 用 文 獻

- 點澤啓夫・古田要二・倉田啓而・佐藤文子 (1964) 蠶의 傳染性軟化病ウイルスに關する研究. 日蠶試報. 19(2) : 223-240.
- Brown, D. A., C. J. Allen and G. N. Bignell (1982) The use of a protein A conjugate in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) of four closely related baculoviruses from *spodoptera* species. J. Gen. Virol. 62 : 375-378.
- 古田要二・滝口義夫・石井正市 (1976) ウイルス性軟化病の血清學的 診斷法における沈降反應の反應條件とウイルス抗原の檢出. 蠶絲研究 98 : 50-57.
- 古田要二・清水孝夫 (1978) 家蠶軟化病ウイルスの定量

接種におけるウイルス抗原の檢出時期. 蠶絲研究 106: 100-105.

福原敏彦・練川眞理 (1981) 人工飼料育蠶の集團に發生する細胞質多角體病の檢出法. 日蠶雜 50(4) : 345-346.

井上元・點澤川壽 (1971) 螢光抗體法による家蠶ウイルス性軟化病の診斷に關する研究. 日蠶試報 25(1) : 21-41.

岩下嘉光 (1965) ウイルス性軟化病蠶の中腸皮膜組織における組織. 細胞病理學的 觀察. 日蠶雜 34(4) : 263-273.

Kawarabata, T. and S. Hayasaka (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of strains of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae). J. Invertebr. Pathol. 50 : 118-123.

川瀬茂實 (1990) 總說カイコの核多角體病ウイルス-最近の研究を中心に-. 日蠶雜 59(6) : 387-401.

川瀬茂實・橋本義文・中桓雅雄 (1980) 家蠶の軟化病ウイルス(坂城株)の化學的 性狀について. 日蠶雜 49(6) : 477-484.

金權榮・姜錫權 (1984) 家蠶의 傳染性軟化病 및 濃核病 바이러스 增殖에 關한 研究. 韓蠶學誌, 25(2) : 1-31.

金權榮・姜錫宇・姜錫權・金洛相 (1991) 韓國産軟化病 바이러스의 分離 및 性狀. 韓蠶學誌, 33(1) : 13-20.

Kurihara, Y., H. Watanabe, S. Maeda and T. Shimizu (1984) Chemical characteristics of previously undescribed densovirus isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. Japan, 44(1) : 45-48.

Langridge, W. H. R., R. R. Granados and J. F. Greenberg (1981) Detection of *Autographa californica* and *Heliothis zea* baculovirus proteins by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). J. Invertebr. Pathol. 38 : 242-250.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. L. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Morris, T. J., P. V. Vail and S. S. Collier (1981) An RNA virus in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus preparations: detection and identification. J. Invertebr. Pathol. 38 : 201-208.

Payment, P., D. J. S. Arora and S. Bellonck (1982) An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cytoplasmic polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 40 : 55-60.

關宏夫・關島安隆 (1976) Single radial immunodiffusionによる蠶ウイルス性軟化性 特異抗原の檢出. 日蠶雜 45(1) : 13-18.

秋葉芳男 (1978) Es法の改良-蠶體スライス法による1FV抗原の檢出. 奇玉蠶試報 50 : 39-42.

清水進 (1982) カイコ軟化病ウイルスのEnzyme linked immunosorbent assayによる檢出. 日蠶雜 51(5) : 370-373.

Shimizu, S., M. Ohba, K. Kanda and K. Aizawa (1983) Latex agglutination test for the detection of the flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Inver-

- tebr. Pathol. **42** : 151-155.
- 清水孝夫 (1975) 伊那市の農家の病蠶から分離した軟化病ウイルスの病原性. 日蠶雑 **44**(1) : 45-48.
- Tijssen, P. and E. Kurstak (1984) Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassay. Anal. Biochem. **136** : 451-457.
- Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett (1979) Abstracts of microplate enzyme linked immunosorbent assays. In "The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) A guide with abstracts of microplate applications." (Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett eds), dynatech laboratories INC., pp. 69-124.