

PCR법에 의한 잠실먼지 중 핵다각체병 바이러스의 검출

남성희 · 한명세* · 이영근 · 강석우 · 황재삼
농촌진흥청 잠사곤충연구소, *경북대학교 농과대학

Detection of Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus(BmNPV) in dust of Silkworm rearing room by PCR

Sung Hee Nam, Myung Sae Han*, Young Keun Lee, Seok Woo Kang
and Jae Sam Hwang

National Sericulture and Entomology Research Institute, RDA, Suwon 441-100, Korea
*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 707-701, Korea

ABSTRACT

A rapid and sensitive detection of BmNPV contamination in silkworm rearing room was carried by Polymerase chain reaction(PCR). Silkworm nuclear polyhedra were dissolved for the extraction of viral DNA within 30 minutes followed by the treatment of alkaline solution. The combination of primers of NP3 and NP2 was superior in PCR to the other 7 primers applied. Each primer was designed with 20 base in size and Newly designed NP3 of sense and the already reported NP2 for antisense were better in reaction than other primers. PCR products appeared 500bp in size. And annealing was confirmed proper at 55°C condition. Amplifiable template DNA amount was confirmed at least 100ng to 0.1ng and regarded as applicative for the assay of silkworm rearing environmental condition of sericultural farm. In case of the detection of BmNPV from the dust, sensitivity by PCR was as high as 1,000,000 times than that of microscopic observation.

Key words : Bombyx mori, Diagnosis, NPV, PCR

서 론

누에 핵다각체병 바이러스(BmNPV)는 경구감염으로 중장을 제외한 각종 조직의 세포핵에 침입 증식하여 다각체를 형성하며, 병세의 진전에 따른 이병조직의 파괴로 다량의 다각체가 체액 속으로 유입된다(保坂 等, 1979). 또한 이 병의 특징은 감염 말기에 누에 진피조직의 파괴로 인한 잠좌내 감염이 발생하여(田中, 1981; 荒武·栢村, 1974) 핵다각체병이 만연되는 것이다. 현재 양잠 농가에서는 누에 핵다각체병으로 인한 피해가 가장 커서 2령 말기에 0.01%의 병잠이 혼입된 경우에는 20%의 높은 감염율이 입증되었다(野口, 1994).

누에 바이러스성 무름병의 진단에는 형광항체법(前田·渡部, 1978), Single radial immuno-diffusion법(Seki, 1976), 라텍스 응집반응(Shimizu, 1983; 清水·荒川,

1986), ELISA법(清水, 1882) 등 여러 가지 진단법이 응용되고 있다. 그러나 핵다각체병의 진단에는 바이러스 감염 초기 진단이 어려운 외부병징(關雄, 1987)의 육안 관찰이나 누에의 조직관찰(阿部·鮎澤, 1974) 혹은 Giemsa 염색 후 현미경 관찰(Poinar, 1982)등의 방법이 사용되어져 왔다. 그러므로 핵다각체병 바이러스를 감염초기에 신속히 검출하여 핵다각체병의 확산을 사전에 예방할 수 있는 조기진단법의 개발이 요구된다. 따라서 잠작 안정을 위해서는 사육환경 예찰에 의한 예방이 효과적인 대책이 될것이다.

최근에 개발된 PCR법은 목적 DNA와 상보적인 DNA를 합성하여 단시간에 대량 증폭할 수 있으며, 유전병의 진단(淺野 等, 1993; 野口 等, 1995)은 물론 각종 생물의 분자생물학적 연구에도 응용되고 있다(Navot *et al.*, 1989).

따라서 본 연구는 PCR법에 의한 양잠농가의 핵다각체병 조기진단 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 공시 바이러스 및 다각체 용해

잠사곤충연구소 보존 누에 핵다각체병 바이러스 표준 계통을 사용하였다. 바이러스 다각체를 누에에 경구접종 후 전형적인 병징을 나타내는 누에의 체액을 채취하여 3,000 rpm, 10분간 수회 원심분리하여 다각체를 정제하였다. 그리고 알칼리액(0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaCl, 10 mM EDTA, pH 10.8)과 2배 농축액을 각각 조제하여 순수다각체와 1:1 또는 1:2 비율로 혼합한 후 처리 시간별로 다각체의 용해 여부를 광학현미경(Nikon UFX-II)으로 관찰하였다.

2. 바이러스 DNA 추출

핵다각체병 바이러스의 DNA 추출은 Iatrou 등(1985)의 방법으로 수행하였다. phenol/chloroform(1:1) 용액을 시료와 동량으로 혼합하여 원심분리(12,000 rpm, 4°C)후 상등액을 회수하였다. 여기에 chloroform/isoamylalcohol(24:1) 용액을 동량 첨가 혼합 후 다시 원심 분리하고, 상등액에 salted ethanol(5M NaCl)을 가하여 침전시킨 DNA를 원심하여 70% ethanol로 세척한 후 건조시켜 TE 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA)을 첨가하고 10 µg/ml의 RNase A를 처리하였다(37°C, 2 hr). 다시 2회의 phenol/chloroform 추출 및 salted ethanol에 의한 DNA 침전과 ethanol 세척 후 건조하여 TE 완충액에 현탁 후 분광광도계로 농도 및 순도를 확인하고 template DNA로 사용하였다.

3. PCR 조건 설정 및 전기영동

핵다각체병 진단에 적합한 oligonucleotide primer를 선발하고, 주형 DNA는 m당 100, 50, 30, 10, 1ng 및 100pg에서 최적 농도를 구명하고, annealing 온도는 40, 45, 50, 55°C에서 PCR을 행하여 최적반응 조건을 구하였다.

위의 조건을 기초로 template DNA 10 ng, dNTP mixture(한국생공) 200 µM, oligonucleotide primer 100 pmole 그리고 Taq DNA polymerase(한국생공) 1 unit를 첨가하고 증류수로 총 25 µl로 조정하여 mineral oil(SIGMA)을 25 µl 적하 후 원심하였다. PCR을 Thermo cycler(Perkin-Elmer, U.S.A)의 기종을 사용하였으며, 조건은 94°C에서 5분간의 열 변성 후 94°C에서 60초, 55°C에서 60초, 72°C에서 90초를 1회로 하여

30회 반응시켰다. 최종증폭(last extension)은 72°C에서 5분간 수행하였다.

PCR 반응산물 3 µl를 sample buffer(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol)와 혼합하여 2% agarose (SIGMA) gel에 loading한 후 TAE 완충액(0.04M Tris acetate, 1mM EDTA, PH 8.0)에서 전기영동(7.5 volts/cm)하였다. 전기영동 후 Ethidium bromide(EtBr) 2 µg/ml로 5분간 염색하고 증류수로 10분간 세척한 다음, 자외선(260 nm)하에서 관찰하였다.

4. 잠실 먼지중의 핵다각체병 바이러스 검출

잠실 먼지는 경기도 화성군 일대(3개소)와 청주 잠업연수원(1개소) 및 수원 잠사곤충연구소(2개소)를 대상으로 잠실 당 5~6점의 시료를 채집하여 시험구별로 시료 2배량의 증류수를 가하여 조제하였다. 30분간 자연 침강후, 여과한(Whatman No. 4, 여과지) 부유액을 얻었으며 이를 광학현미경 관찰과 생물검정 및 PCR용 시료로 이용하였다.

위의 실험에서 얻어진 부유액을 시료별로 500 µl씩 취하여 알칼리 처리와 DNA 추출 및 PCR을 수행하였다. 한편 생물검정은 田中·清水(1980)의 방법에 따라 인공사료 절편에 부유액을 포화상태로 첨가하고 1령 1일째 누에를 100두씩 공시하여 직경 12 cm 사례에서 사육하였으며 2차 감염을 방지하기 위해 2령까지 사육 기간 중의 병잠 발생 유무를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 바이러스 DNA 추출 및 Primer선발

바이러스 DNA 추출을 위한 前 처리 과정은 1×10⁷/ml 농도로 정제한 다각체 용액에 2배 농축액으로 조제한 알칼리액과 동량 혼합 후 핵다각체 용해에 필요한 알칼리액의 처리량과 시간을 조사하였다. 실온(25°C)에서 광학현미경으로 다각체의 용해 여부를 관찰하였을 때, 5분 후에는 다각체가 부분적으로 붕괴되어 남아 있는 양이 1/2 정도였으며, 15분 경과 후 다각체의 윤곽이 거의 없어지고 절편만이 남아 있었으며 30분이 경과된 후 완전 용해되었다(표 1). 위 실험의 결과를 기준으로 시료가 순수다각체인 경우에는 2배량 알칼리액 첨가시 시료와 동량 혼합하여 30분 처리하는 것이 적당하였다.

누에 핵다각체병 바이러스의 polyhedrin gene(Iatrou et al., 1985)에 근거하여 누에 핵다각체병 바이러스 진단을 위한 PCR 반응을 위해 6종의 oligonucleotide primer를 설계하고 NP1~NP6으로 명하였다. NP1,

Table 1. Condition of alkali-treatment to dissolve the nuclear polyhedra

Concentration of alkali solution	Polyhedra : Alkali solution	Time			
		5 min	15 min	30 min	60 min
1×(a)	1:1	+++	+++	++	-
	1:2	+++	++	++	-
2×(b)	1:1	++	+	-	-
	1:2	++	±	-	-

a) proportion of undissolved polyhedra in alkali solution (0.1M Na₂CO₃, 0.1M NaCl, 10 mM EDTA, pH 10.8) : +++(3/4), ++(1/2), +(1/3), ±(1/4), -: completely dissolved

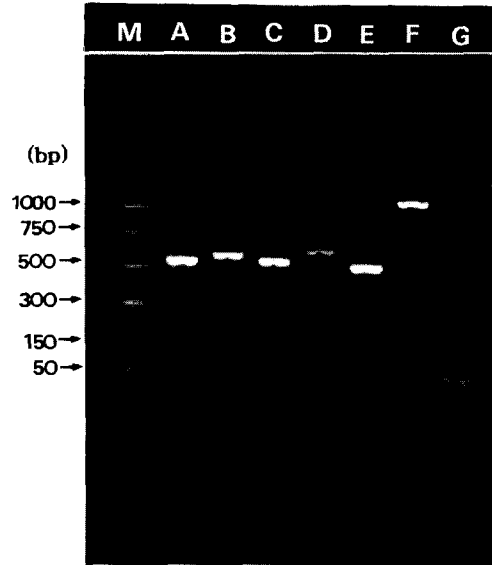
b) proportion of undissolved polyhedra in 2×alkali solution(0.2M Na₂CO₃, 0.2M NaCl, 20 mM EDTA, pH 10.8) : +++(3/4), ++(1/2), +(1/3), ± (1/4), -: completely dissolved

NP3, NP5는 sense primer이고 NP2, NP4, NP6은 antisense primer로서, NP1, NP2는 野口(1994)의 자료에서 인용하였고, primer NP3, NP4, NP5 및 NP6은 직접 설계하였다. 위의 6종은 모두 20 base로 구성되어 있으며, 합성 DNA의 크기는 가능한 약 500 bp 내외가 되도록 하였다.

NPV 염기서열에서 ORF를 기준으로 정방향 및 역방향의 6종 primer로부터 9개 조합이 가능하였으며 그 중 PCR primer로서 부적합한 2개 조합 즉 NP1/NP6(F) 및 NP3/NP6(G)를 제외한 7쌍의 조합으로부터 primer의 적합성을 검증하기 위한 PCR을 행하였다(표 2). 그 결과 시험구 F, G의 증폭산물의 크기는 약 1,000 bp 내외로써 증폭 효율이 낮았다. 반면 A, B, C, D, E는 500 bp 정도로서 PCR용 primer에 적합한 크기로 나타났다. 그러나 A, B, C, D는 재현성이 떨어지거나 비특이 밴드의 출현이 있었고, 시험구 E(NP3, NP2)는 특이적으로 증폭된 DNA 밴드가 명료하고 재현성도 표 3에 제시한 7가지 primer 중에서 가장 우수하였다(그림 1).

Table 2. Primers for Polymerase Chain Reaction

Oligo nucleotides	Sequence	Nucleotide Localization
NP1 5'	CGTACTTACGTGTACGACAA 3'	+34~+53
NP2 5'	TCGAACGAGTTGGTGTACTC 3'	+556~+575
NP3 5'	GGGCGGTCTCATCAAAAACG 3'	+72~+91
NP4 5'	CTTCGGCAGAGTCTGTGCCG 3'	+630~+649
NP5 5'	TGAAAGAATGCGTAGAAGGA 3'	-507~+488
NP6 5'	GATGGTGGGGTTGTATGAAT 3'	+11~+30

**Fig. 1.** Amplification products as a result of treating various PCR primer in the same reaction condition. The numbers at the left side indicate base pairs.

lanes : M, PCR Marker; A, NP1 NP2; B, NP3 NP4; C, NP5 NP6; D, NP1 NP4; E, NP3 NP2; F, NP5 NP2; G, NP5 NP4.

2. PCR을 위한 최적 Annealing 온도

주형 DNA의 농도 100, 50, 30, 10, 1, 0.1 ng/ml 증폭 시험 결과 모든 시험구에서 DNA의 증폭은 확인되었으며, 특히 최소 농도인 100 pg에서도 선명한 밴드를 얻었으며(그림 2), 이는 바이러스 진단에서 효율적인 것으로 알려진 ELISA법(姜等, 1993)의 검출농도 1 ng/ml 경우보다도 검출효율이 우수한 것으로 인정되었다.

목적으로 하는 DNA의 효과적인 증폭을 위하여는 annealing 온도, Mg²⁺ 농도, primer, 효소, 시료농도, cosolvent 등 여러 가지 요인이 작용한다. 먼저 정확한 primer의 설계 후 시료와 primer간의 농도 균형이 적절해야 하는데, 그 중에서도 특정 DNA에 맞는 annealing 온도는 PCR 증폭의 최적화를 가능하게 한다(Yoon, 1992). 본 시험에서는 annealing 온도 40, 45, 50, 55°C의 모든 처리구에서 NPV 특이밴드가 보였다. 그러나 40, 45, 50°C에서는 재현성이 낮고 비특이 밴드가 출현하였다(그림 3). 그리고 55°C에서는 PCR 산물이 뚜렷할 뿐만 아니라 비특이 밴드도 완전히 소실되었다. 따라서 annealing은 55°C에서 증폭이 가장 효과적인 것으로 인정되었다.

3. 사육환경 중의 바이러스 검색

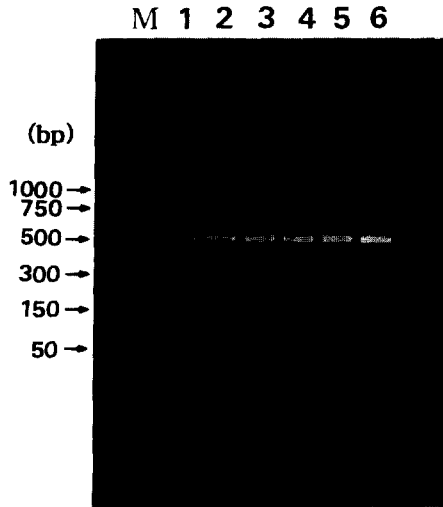


Fig. 2. Amplification products as a result PCR by different amount of genomic DNA treated.
lanes : M, PCR Marker; 1, PCR products from using 100 pg; 2, 1 ng; 3, 10 ng; 4, 30 ng; 5, 50 ng; 6, 100 ng.

PCR에 의한 다각체 바이러스 검색기술의 유용성을 실증하기 위해 농가, 잠업연수원 및 잠사곤충연구소의 잠실 6곳을 선정하고, 사육실의 먼지를 수집하여 조사하였다. 선정된 잠실 중 농가 3곳 및 잠업연수원은 지난 사육기 핵다각체병이 발생하지 않은 곳이며, 잠사곤충연구소 잠실은 핵다각체병잡 증식 시험을 했거나 핵다각체병이 발생한 잠실이였다. 수집한 시료를 증류수에 용해시킨 후 광학현미경 관찰과 생물검정 및 PCR을 수행하였다(표 3). 농가 A, B, C에서는 다각체를 현미경 하에서 관찰할 수 없었으나 연수원(D) 및 잠실(E, F)에서는 시야 당 2~3개의 다각체가 관찰되었다.

또한 생물검정에서는 선정된 잠실로부터 채집한 먼지를 인공사료에 도달하여 개미누에에 침식시킨

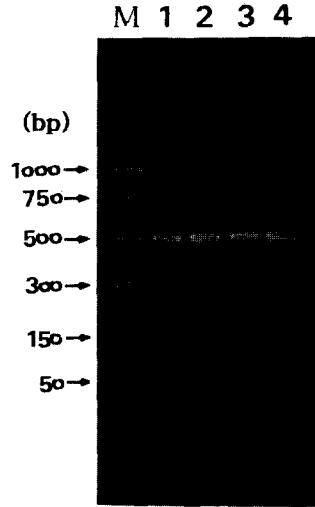


Fig. 3. Amplification products as a result of treating with various annealing temperature.
lanes : M, PCR Marker; 1, 55°C; 2, 50°C; 3, 45°C; 4, 40°C.

후 2령 말기까지 관찰하였다. 그 결과 $1 \times 10^7/ml$ 농도의 다각체를 접종, 침식한 대조구는 만 2일이 경과한 후 90% 이상의 치사율을 보였다. 한편 검정용 시험구 D, E, F에서는 2~3일에 걸쳐 병잠이 나타났으며, 농가 B, C에서도 발육 경과가 불균일하게 지속되면서 잠에 들지 못하였고 접종 후 2~5일에 걸쳐 핵다각체병 감염잠이 발생하였다. PCR에 의한 진단에서는 현미경 관찰 하에서 양성으로 나타났던 시험구 D, E, F에서 뚜렷한 NPV 특이 밴드를 확인할 수 있었으며 다각체를 전혀 관찰할 수 없었던 농가 B, C에서도 특이 밴드가 검출되었다(그림 4).

결과적으로 광학현미경 검사는 1~2시간 내에 핵다각체의 유무를 판별할 수 있지만, 광학현미경($\times 600$) 하에서 시야당 다각체 한 개를 관찰하려면 잠실 먼지 용해 속의 다각체 농도가 $2.5 \times 10^5/ml$ 이상이 되어야

Table 3. Results of detecting BmNPV isolated from dust of silkworm rearing room by Microscopic Observation, Bioassay and Polymerase chain reaction

No.	Name of Sample	Method		
		Microscopic observation	Bioassay	PCR
1	Control	Positive	Positive	Positive
2	Farm (A)	Negative	Negative	Negative
3	Farm (B)	Negative	Positive	Positive
4	Farm (C)	Negative	Positive	Positive
5	Training Center(D)	Positive	Positive	Positive
6	Silkworm rearing room(E)*	Positive	Positive	Positive
7	Silkworm rearing room(F)**	Positive	Positive	Positive

* , ** : Lab. of Disease and Pest Control, National Sericulture and Entomology Research Institute.

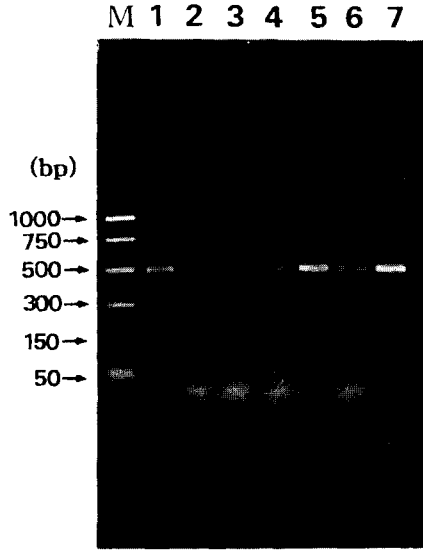


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of the products as a result of PCR amplification of viral DNA isolated from dust of silkworm rearing room. lanes: M, PCR marker; 1, control (polyhedra); 2, farm(A); 3, farm(B); 4, farm(C); 5, Training center in Cheong-Ju(D); 6, Silkworm rearing room in Institute(E); 7, Silkworm rearing room in Institute(F).

한다. 따라서 농가 B, C 시험구와 같이 극미량의 다각체를 포함한 잠실먼지는 광학현미경에 의한 검사 시 검출될 확률이 매우 낮다. 또한 검정용 누에를 이용한 생물검정법은 가장 정확한 방법이지만 누에 사육에 많은 시간이 소요되었다. 그러나 PCR에 의한 핵다각체병 진단법에서 핵다각체병 바이러스의 염기서열을 이용한 primer 제작은 진단에 필요한 항체나 cDNA library 등의 제작단계가 없으므로 전기영동으로 진단하는 그 과정이 간단하여 시험 조건만 확립되면 신속, 정확하게 진단할 뿐 아니라 이중 감염잠에서 혼재하는 목적 바이러스를 검출하는 경우에도 유리할 것이다. 따라서 PCR을 이용한 누에 핵다각체병 바이러스 검출은 핵다각체병의 조기진단과 사육전, 후 잠실에 대한 병원체의 오염 유무를 검지할 수 있으며 나아가서는 환경 생물학 분야에서 미생물성 환경요인 조사 및 평가에도 활용될 수 있을 것이다.

적 요

누에 핵다각체병의 조기진단 기술을 개발하고 그 예방을 위한 목적으로 PCR법의 최적 조건설정 및 잠실먼지를 대상으로 잠실환경에 대한 실증시험을 수

행한 결과는 다음과 같다.

1. DNA 추출을 위해 알칼리액 첨가시 다각체가 완전히 용해되는 조건은 순수다각체는 30분을 처리하였을 때 완전 용해되었다.

2. PCR에 효율적인 primer를 선발한 결과 NP3, NP2의 조합이 가장 우수하였다.

3. 특이적 바이러스의 진단 가능한 DNA 증폭한계는 100 pg이었으며, annealing 온도는 55°C가 적당하였다.

4. 잠실 먼지를 이용한 핵다각체병 바이러스 검색에서 광학현미경과 생물검정법 및 PCR을 수행한 결과 PCR에 의한 진단은 기존의 진단법에 비해 고감도로 사육환경 중의 바이러스 DNA를 검출할 수 있었다.

인용문헌

- 阿部芳彦·鮎澤千尋 (1974) 카이코의各種組織における核多角體病感受性に關する研究, 1. 低4溫處理蠶における中腸膜組織の感受性の變化. 日蠶雜 43(3): 200-205.
- 荒武義信·栢村鶴雄 (1974) 카이코의各種ウイルス病の蠶座内における二次感染について. 日蠶雜 43(2): 150-156
- 淺野眞一郎·伴戸久徳·飯塚敏彦 (1993) PCR法によるBacillus thuringiensis cry II 遺傳子の増幅と同定. 日蠶雜 63(3): 223-227
- Iatrou, K., Ito, K. & Witkiewicz, H. (1985) Polyhedrin gene of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 54: 436-445
- 姜錫宇·南聖姬·金槿榮 (1993) 單克隆性 抗體 製作에 의한 누에 바이러스性 무름병의 診斷. RDA. J. Agri. Sci. 35(2): 734-737
- 前田 進·渡部 仁 (1978) 카이코における濃核病ウイルス感染の螢光抗體法による觀察. 應動昆. 22(2): 98-101
- Navot, N., Ber, R. & Czosnek, H. (1989) Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. Phytopathology 79: 562-568
- 野口洋子·小林正彦·山鳥田透 (1994) ポリメラゼ連鎖反應による飼育殘沙をきのち含めた大量試料からの核多角體病蠶の檢出. 日蠶雜 63(5): 399-406
- 野口洋子·小林正彦·山鳥田透 (1995) ポリメラゼ連鎖反應によるカイコ核多角體病ウイルス檢出術の簡易化. 日蠶雜 64(4): 352-359
- Poinar, G. O. (1982) Diagnostic Manual for the Identification of Insect Pathogens. PLENUM PRESS: 185-187
- 關雄 夫 (1987) 蠶の病蟲害防除指導の手引. 日本蠶絲新聞社: 12-13
- 關雄 夫·關島安隆(1976) Single radial immunodiffusionによる蠶ウイルス性軟化病特異抗原の檢出に

- ついて. 日蠶雜 **45**(1): 13-18.
- Shimizu, S. (1983) Latex agglutination test for the detection of the flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 151-155
- 清水 進 (1982) カイコ軟化病ウイルスのenzyme-linked immunosorbent assayによる検出. 日蠶雜 **51**: 370-373
- 清水 進・荒川昭弘 (1986) 蠶の細胞質多角體ウイルスおよび濃核病ウイルスのラテックス凝集反応による検出. 日蠶雜 **55**(2): 153-157
- 田中茂男 (1981) 人工飼料育蠶における核多角體病の蠶座内感染について(續報). 日蠶雜 **50**(2): 115-119
- 田中茂男 清水孝夫 (1980) 人工飼料育蠶における核多角體病の蠶座内感染について. 日蠶雜 **49**: 211-217
- 保坂康弘・川瀬茂實松・井千秋 (1979) ウイルス圖鑑. 講談社: 337
- Yoon, C. S. (1992) Examination of Parameters Affecting Polymerase Chain Reaction in studying RAPD. *Korean Mycol.* **20**: 315-323