Korean Journal of Environmental Agriculture

Korean J Environ Agric. 2017;36(4):241-248. Korean
Published online 2017 November 27. https://doi.org/10.5338/KJEA.2017.36.4.36

Online ISSN: 2233-4173
Print ISSN: 1225-3537

Research Article

Open Access

꿀벌에 대한 dsRNA의 급성섭식독성 평가

임혜송[1], 정영준[1], 김일룡[1], 김 진[2], 유성민[2], 김반니[3], 이중로[1], 최원균[1*]

[1]국립생태원 생태연구본부 생태보전연구실, [2]경농 중앙연구소, [3]한경대학교 미래융합기술대학원

Acute Oral Toxicity of dsRNA to Honey Bee, *Apis mellifera*

Hye Song Lim[1], Young Jun Jung[1], Il Ryong Kim[1], Jin Kim[2], Sungmin Ryu[2], Banni Kim[3], Jung Ro Lee[1] and Wonkyun Choi[1*] ([1]Division of Ecological Conservatioin, Bureau of Ecological Research, National Institute of Ecology, Seocheon 33657, Korea, [2]Central Research Institute, Gyeongju 38175, Korea, [3]Graduate School of Future Convergence Technology, Hankyong National University, Anseong 17579, Korea)

Received: 18 October 2017/ Revised: 17 November 2017/ Accepted: 22 November 2017

ORCID
Hye-Song Lim
http://orcid.org/0000-0002-9164-9504

Won-Kyun Choi
http://orcid.org/0000-0001-5190-0541

Abstract

BACKGROUND: RNA interference (RNAi) eliminates or decreases gene expression by disrupting the target mRNA or by interfering with translation. Recently, RNAi technique was applied to generate new crop traits which provide protection against pests. To establish the environmental risk assessment protocol of RNAi LMO in lab scale, we developed dsRNA expression system using *E. coli* and tested acute oral toxicity assay to honey.

METHOD AND RESULTS: The dsRNA expression vector, L4440, was chosen and cloned 240 bp of Snf7 and GFP gene fragment. To develop the maximum dsRNA induction condition in *E. coli*, we tested induction time, temperature and IPTG concentration in media. To estimate the risk assessment of dsRNA to honey bee, it has been selected and cultured with dsRNA supplement for 48 hours according to OECD guideline. As a result, the optimum condition of dsRNA induction was 37℃, 4 hours and 0.4 mM IPTG concentration and the difference between Snf7 and GFP dsRNA molecules from *E. coli* was not significant in survival and behavior to honey bee. Furthermore, blast search results indicated that effective match of predicted dsRNA fragments were not existed in honey bee genome.

CONCLUSION: In this study, we developed and tested the acute oral toxicity of dsRNA using *E. coli* expression system to honey bee.

Key words: Acute oral toxicity, *Apis mellifera*, dsRNA, Living modified organisms

*Corresponding author: Wonkyun Choi
Phone: +82-41-950-5417; Fax: +82-41-950-5934;
E-mail: wonkyun@nie.re.kr

서 론

인구증가와 경작지 감소 등으로 인류가 직면한 식량 문제를 해결하기 위하여 생명공학기술을 이용한 다양한 유전자변형(Living Modified, LM) 작물이 개발되었다. International Service for the Acquisition of Agribiotech Application (ISAAA)에서 2016년 공개한 자료에 따르면 LM 작물은 전 세계 28개국 179 백만 헥타르 (ha)의 면적에서 재배 중이며 이는 해당 작물 총재배면적의 절반 가량을 차지한다. 또한 전 세계 39개국에서 LM 작물을 수입하고 있으며 우리나라도 낮은 곡물자급률로 인해 많은 양의 곡물을 수입하는데 주요 수입곡물의 대부분을 LMO가 차지하고 있다.

최근 신기술을 이용한 다양한 종류의 LM 작물이 개발되고 국내 수입 및 유통됨에 따라 자연생태계로의 비의도적 유출 사례 또한 지속적으로 증가하고 있다. 이러한 신기술이 적용된 RNAi 기반 LMO가 국내 생태계에 미칠 수 있는 위해성에 대해 과학적인 위해성평가를 수행할 수 있도록 평가 기반을 마련하고, 국내 비표적생물체에 대한 위해성 조사를 통해 신규 LMO 위해성 심사 시 국내 실정에 맞는 위해성 심사

항목 개발과 평가 범위 설정 등 신기술 LMO에 대한 안전관리 체계 확립이 지속적으로 요구되고 있다.

RNA 간섭(RNA interference, RNAi) 기술은 *Caenorhabditis elegans*에서 처음 보고(Fire *et al.*, 1998) 된 이래로 다양한 생물종에서 유전자의 기능 연구에 활용되고 있으며, 포유류에서도 서열특이적인 발현억제가 가능해지면서 이 기술에 대한 응용연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 LMO 개발에 RNAi 기술이 적극 활용되고 있으며 해충의 생명유지에 중요한 mRNA일부를 dsRNA형태로 식물체에 발현시켜 이를 섭식한 해충의 체내로 dsRNA가 전달되어 목표유전자의 발현을 억제하여 결국 해충을 사멸시킨다.

RNAi를 이용한 곤충의 유전자 억제 연구는 *Aedes aegypti, Harmonia axyridis, Acyrthosiphon pisum, Epiphyas postvittana* 등 다양한 종에서 수행되었다(Niimi *et al.*, 2005, Turner *et al.*, 2006, Jaubert-Possamai *et al.*, 2007, Coy *et al.*, 2012). 해충 방제를 위한 RNAi 연구는 *Hyalophora cecropia*를 비롯하여, *Spodoptera litura, Plutella xylostella, Spodoptera frugiperda, Choristoneura fumiferana* 등에서 진행되었으며(Bettencourt *et al.*, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002, Bautista *et al.*, 2009, Rodriguez-Cabrera *et al.*, 2010, Quan *et al.*, 2013), 국내에서도 *Spodoptera litura*와 *Bemisia tabaci*에 대한 새로운 방제법 개발을 위하여 RNAi 적용대상 유전자 연구가 진행된 바 있다(Jeon *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2015).

최근 RNAi기술을 이용하여 해충방제 효과를 갖는 LMO가 개발되었으며, 식품 및 사료용으로 국내에 수입이 승인되었다. 해당 이벤트는 서부옥수수뿌리벌레(WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte)에 저항성을 갖는 옥수수로서 Snf7 유전자의 mRNA 절편을 옥수수에 dsRNA 형태로 발현시켜 해충의 피해를 방지하는 것으로 알려져있다(Bolognesi *et al.*, 2012, Ramaseshadri *et al.*, 2013, Ko i *et al.*, 2014). Snf7 단백질은 ESCRT-III 그룹에 속하며 endosomal-autophagic 기작을 통해 단백질을 분해하는 과정에 관여하는 것으로 알려져있다(Henne *et al.*, 2011, Wegner *et al.*, 2011).

대표적인 화분매개 곤충인 꿀벌(*Apis mellifera*)은 농약성분의 안전성 평가를 비롯한 각종 환경위해성 평가 연구의 주요 위해성평가 대상종으로 취급되고 있다(Henry *et al.*, 2012). 꿀벌에 대한 위해성평가 시험법으로 OECD에서는 성충에 대한 급성독성시험법, 유충 독성시험법과 semi-filed 시험법 사용을 권고하고 있다. 현재 우리나라에서는 급성독성시험과 엽상잔류독성에 대해 유해성평가 방법으로 사용하고 있으며, 급성독성시험 결과를 평가한 후 엽상잔류독성시험 여부를 결정하고 있다. 독성물질에 대한 영향은 접촉독성과 섭식독성의 노출 우려가 높은 꿀벌유충이 꿀벌성충에 비해 크다고 알려져 있으나 국내 유해성평가에서는 적극적으로 활용되지 못하고 있는 실정이다.

서부옥수수뿌리벌레의 DvSnf7 mRNA를 목표로 하는 dsRNA에 대한 꿀벌의 위해성평가는 이미 몇 차례 보고된바 있다(Tan *et al.*, 2015, Vélez *et al.*, 2016). 기존 연구에서는 Snf7 유전자와 V-ATPase 유전자의 단편을 각각 이용하였으며, 목표유전자와 대조군인 GFP 유전자의 dsRNA 발현을 위하여 *in vitro* transcription 방법을 사용하였다. 본 연구는 대장균 HT115 (DE3)를 이용하여 dsRNA의 최적발현 조건을 확립하였으며, 다양한 유해성평가분야에서 대상종으로 활용되는 꿀벌을 이용하여 Snf7과 GFP dsRNA의 유해성평가를 수행하였다. 본 연구방법 및 연구결과는 향후 실험실 수준에서 dsRNA에 대한 유해성평가를 수행하고자 할 때 dsRNA 물질의 대량분리 및 꿀벌의 급성섭식독성 평가에 표준화된 유해성평가 방법으로 활용될 것으로 사료된다.

재료 및 방법

dsRNA 발현 시스템 구축

대장균에서 dsRNA를 대량발현고자 L4440 vector와 HT115 (DE3) 대장균을 선택하였다. L4440 vector는 삽입된 유전자의 양 말단에 T7 promoter가 마주보도록 위치하여 IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)에 의해 발현된 RNA가 dsRNA로 되도록 제작된 vector이며, HT115 (DE3) 대장균은 RNaseIII가 결핍되어 세포내에 다량의 dsRNA를 축적하는 특징을 갖는다(Timmons *et al.*, 2001). L4440 vector에 240bp의 Snf7과 GFP 유전자를 클로닝하기 위하여 Bachman(2013)의 논문에 명시된 Snf7 유전자 서열을 ㈜마크로젠을 통해 합성하였으며, 대조군을 위한 GFP 유전자는 mGFP 유전자를 PCR로 증폭하였다. 각 유전자의 N-말단에 BamH Ⅰ 부위와 C-말단에 Xho Ⅰ 부위를 삽입하여 클로닝 한 후 각각의 제한 효소 반응을 통해 L4440 Snf7 BamH Ⅰ/Xho I 클론과 L4440 GFP BamH Ⅰ/Xho Ⅰ 클론을 제작하였다. 클로닝된 plasmid는 시퀀싱으로 염기서열을 검증하였으며, 확인된 각각의 plasmid는 열충격법으로 HT115 (DE3) 대장균으로 형질전환 후 형성된 colony는 T7 promoter primer를 이용한 PCR을 통해 plasmid의 존재 유무를 확인하였다.

dsRNA 발현 조건 확립 및 정제

Snf7과 GFP dsRNA의 최적 발현 조건을 확립하기 위하여 발현온도(22℃, 30℃, 37℃), IPTG 농도(0.1 mM, 0.4 mM, 1 mM) 그리고 배양시간(2시간, 4시간) 등으로 각기 달리하여 최적 발현 조건 확립 실험을 수행하였다. 조건별로 발현유도를 마친 대장균 배양액은 4℃, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 각각의 시료별로 200 μl의 TE (Tris-EDTA) 버퍼를 넣어 pellet을 푼 후 Lysozyme (400 μg/ml)과 DNaseI (1 unit/ml)을 넣고 RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 total RNA를 정제하였다. 정제된 RNA는 극미량분광흡도계(NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific, USA)을 이용하여 정량 후 -80℃ 초저온냉동고에 사용 전까지 보관하였다.

dsRNA 발현 확인

추출한 dsRNA의 발현량을 확인하기 위하여 10 μg의 total

RNA를 1.5% agarose gel에서 150 V, 20분 동안 전기영동하였으며 ChemiDoc™ XRS+ System(Bio-Rad, USA)으로 증폭된 band를 확인하였다. 또한 발현된 dsRNA를 실시간유전자증폭으로 확인하기 위하여 1 μg의 total RNA를 주형으로 ReverTra Ace-α(TOYOBO, Japan)의 조성액과 함께 각각의 primer를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}배 순서로 희석하였고 최종적으로 10^{-4}배 희석된 cDNA 1 μl를 사용하여 실시간 PCR (Quantitative Realtime PCR, qRT-PCR)을 수행하였다. Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, USA)를 사용하였으며 StepOnePlus Real-Time PCR system(Applied Biosystem, USA)으로 증폭하였다. qRT-PCR 실험에 사용된 primer는 GFP와 Snf7의 염기서열을 이용하여 제작하였고 *E.coli*의 16SrRNA 유전자를 reference 유전자로 사용하였다(Clifford *et al.*, 2012). 증폭된 값은 일원분산분석(one-way ANOVA) 방법을 이용하여 통계적 유의성을 분석하였다.

시험물질 처리농도

최대위해농도는 위해성평가 초기 단계에서 사용하며 포장기대농도의 10~100배의 농도로 처리한다. Snf7 dsRNA가 발현되는 이벤트의 경우 LMO내에 발현되는 Snf7 RNA의 발현량은 극히 적으며, 가장 발현량이 높은 잎 조직의 최대발현량을 근거로 본 연구에서는 최대 발현량의 약 10~100배 범위에 있는 1 μg/g의 최종농도로 정제한 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA가 함유된 total RNA 를 50% 설탕용액에 1:1로 혼합하여 처리하였다.

꿀벌 준비

시험에 사용된 꿀벌 성충은 경상북도 경주시 경농 중앙연구소 사육공간내에 설치된 벌통에서 시험물질 투여 4시간 전에 무작위로 선발하여 스텐레스 철망(높이 15 cm, 직경 5 cm) 형태의 원통형 시험용기에 각각 10마리씩 군 분리하였다. 시험 조건과 동일한 환경조건에서 순화하였으며 순화 시 25% 설탕용액을 유리 급식관에 채워 시험군별로 급이하였다. 시험물질의 제조를 위하여 각각의 시험물질 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA 함유 total RNA(2 μg/ml) 1 ml과 50% 설탕용액 1 ml을 혼합하였다. 각 시험물질별 처리는 제조된 stock solution 0.2 ml씩 처리구에 노출하고, 절식은 투여개시 약 2 시간 전부터 시작하였다. 시험물질 노출 후 4시간 동안 시험물질을 모두 섭식하였으며 다시 정상의 25% 설탕용액을 재급이하였다. 대조구로는 시험물질 무처리(assay control)와 GFP dsRNA를 설정하였다. 급성섭식독성시험은 시험물질의 처리 당일부터 자기온습도기록계(SATO, Japan)를 이용하여 시험종료 시점까지 온도 및 습도를 측정하였으며, 온도는 24.5～25.5℃, 습도는 61～66%를 유지하였다.

꿀벌 사육 및 치사율 확인

dsRNA에 대한 유해성평가를 위해 일반 중독증상 및 생사수를 측정하였다. 시험물질의 처리당일은 1시간, 4시간, 24시간, 48시간 동안 일반중독증상 및 생사수를 관찰하였다. 일반 중독증상은 운동실조, 기능장애, 과민반응, 혼수, 빈사 등을 조사하였다. 치사개체는 더듬이, 날개, 다리 등의 움직임이 없는 개체를 치사개체로 판단하였다.

꿀벌 Genome Blast

Snf7 dsRNA에 대해 꿀벌 genome 내에서 dsRNA로서 기능을 할 수 있는 부위가 존재하는지 확인해 보기 위하여 공개된 bioinformatic tool을 이용하였다. 공개된 검색 tool중 Ensembl Metazoa (http://metazoa.ensembl.org/index.html)의 Blast 기능을 이용하여 Snf7 유전자 240 bp과 꿀벌 genome 서열을 비교분석 하였다.

결과 및 고찰

dsRNA 최적 발현 조건 확립

L4440 Snf7과 L4440 GFP plasmid가 각각 형질전환된 HT115(DE3) 세포에서 plasmid 함유 여부를 확인하기 위하여 T7 promoter primer로 PCR을 수행하였다(Fig. 1). 삽입단편이 없는 vector에서는 약 223 bp 크기의 밴드가 증폭되었으며, Snf7과 GFP가 각각 삽입된 L4440 Snf7과 L4440 GFP 대장균에서는 각각 381 bp 크기의 밴드가 증폭되었다(Fig. 1).

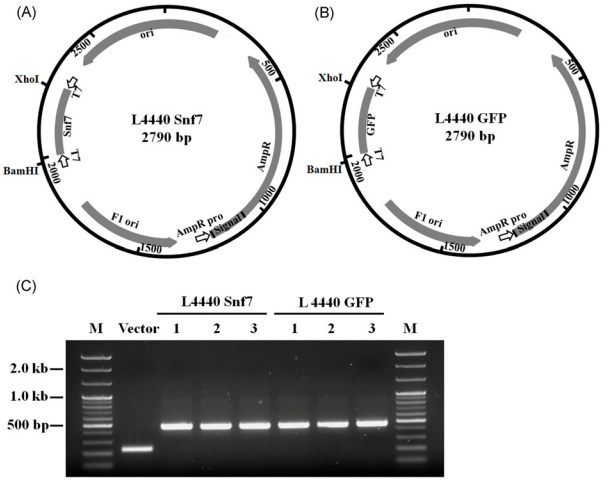

Fig. 1. Diagrams of dsRNA expression plasmid DNA and diagnostic PCR result of transformed HT115 (DE3). (A-B) The dsRNA expression plasmids L4440 with Snf7 (A) and GFP (B) gene fragment. (C) Agarose gel electrophoresis of T7 promoter primer PCR of L4440 empty vector, L4440 Snf7 and L4440 GFP plasmid transformed into *E. coli* HT115. Vector represented L4440 empty vector, lane 2-4 indicated L4440 Snf7 transformed individual *E. coli* cell line and lane 5-7 indicated L4440 GFP transformed individual *E. coli* cell line. M represented 100 bp size marker.

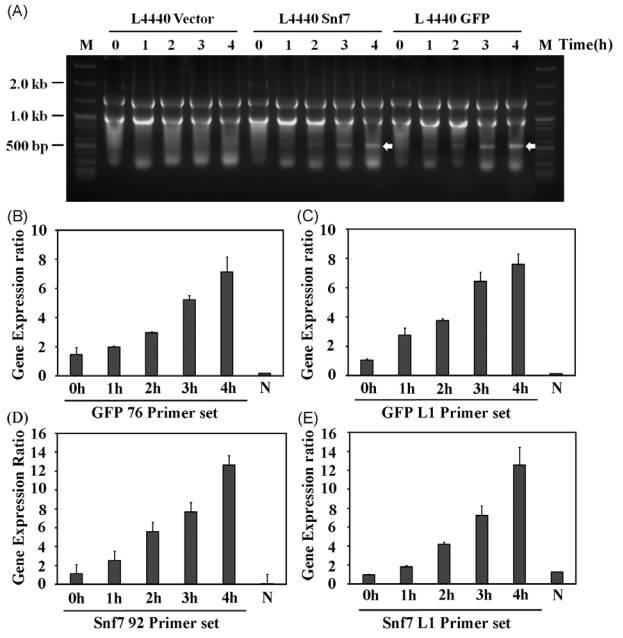

Fig. 2. The expression pattern of Snf7 dsRNA and GFP dsRNA. (A) Agarose gel electrophoresis of purified total RNA of empty vector, L4440 Snf7, L4440 GFP transformed *E. coli* HT115. Each lane represented total RNA of time course induction (1-4hr) by 0.4 mM IPTG. (B-E) Real time PCR analysis of GFP dsRNA using GFP 76 and GFP L1 primer sets (B-C) and Snf7 92 and Snf7 L1 primer sets (D-E). N represents None template PCR control. Arrow indicated dsRNA band.

각각의 대장균에서 IPTG에 의해 실제 dsRNA가 발현되는지 확인하기 위하여 L4440 Snf7, L4440 GFP, L4440 vector가 형질전환된 HT115 (DE3) 대장균을 항생제(Ampicillin)가 함유된 배지에 접종하고 OD_{600}에서 분광흡도가 0.5내외가 될 때까지 37℃에서 배양하였다. Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA의 발현이 유도되도록 배양액에 IPTG (final 0.4 mM) 첨가한 후 4시간까지 각 시간별로 배양액을 샘플링 하였다. 각 샘플에서 total RNA를 분리한 후 1.5% Agarose gel에 전기영동하며 각 시간대별, 각 형질전환된 대장균별 RNA 발현 양상을 확인하였다. 그 결과 L4440 vector, L4440 Snf7, L4440 GFP plasmid가 각각 형질전환된 대장균 배양액에 IPTG 처리 후 1시간이 지난 후부터 4시간까지 dsRNA 발현이 점차 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

발현된 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA 밴드를 검증하기 위하여 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 동일한 조건으로 0.4 mM IPTG를 넣고 배양한 후 시간에 따라 대장균을 샘플링한 후 total RNA를 분리하였다. qRT-PCR은 SYBR Green I을 사용하였으며, Reference gene으로는 대장균의 16S rRNA U16SRT primer와 Snf7, GFP의 primer를 사용하여 GFP와 Snf7 dsRNA의 시간별 발현량의 차이를 확인해 본 결과 dsRNA 발현량이 전기영동 결과와 동일하게 증가하는것을 확인하였다(Table 1, Fig. 2). 따라서 전기영동 결과와 qRT-PCR 결과를 종합해보면 형질전환된 plasmid는 IPTG를 첨가한 후 1시간 이후부터 발현이 시작되며 4시간까지 발현량이 점차 증가한다.

기존 알려진 여러 참고문헌을 바탕으로 L4440 vector에 삽입된 유전자의 특성에 따라 최적의 IPTG농도, 배양온도, 배양시간이 다른 것을 확인하였다(Zhu *et al.*, 2012, Lima *et al.*, 2014). 본 연구에서는 Snf7과 GFP의 최적 배양 온도 및 배양시간, IPTG 농도를 확인하기 위해서 각각 발현조건을 달리하여 최적 발현조건을 확립하고자 실험을 수행하였다(Fig. 3). 서로 다른 IPTG농도(0.1 mM, 0.4 mM, 1 mM)와 배양온도(22℃, 30℃, 37℃) 에서 HT115 (DE3)에 형질전환

Table 1. List of primer for PCR

Primer Name	Sequence (5'→3')	Length (mer)	GC conts (%)	Amplified fragment (bp)	Reference
GFP 76F	GATGGTGATGTTAATGGGCAC	21	48	76	This work
GFP 76R	GGGTAAGTTTTCCGTATGTTGC	22	45		
GFP L1	TGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGT	22	55	100	This work
GFP R1	TGACAAGTGTTGGCCACGGA	20	55		
Snf7 92F	GCGTCGAAAAATAAAAGAGTTGC	23	39	92	This work
Snf7 92R	GTTGTAAGGGTTCCATCTATTTGTAG	26	38		
Snf7 L1	AGTTGCACTCCAAGCCCTCA	20	55	100	This work
Snf7 R1	CGAGGGCTTCCCTCTGCATT	20	60		
U16SRT F	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	21	62	180	Clifford R. J. et al., 2012
U16SRT R	TATTACCGCGGCTGCTGGC	19	63		
GFP BamH1F	GGATCCATGGTAGATCTGACTAGTAAAGG	29	45	252	This work
GFP Xho1R	CTCGAGATCTGGGTATCTTGAAAAGCATTG	30	43		
Snf7 BamH1F	GGATCCATCCATGATATCGTGAACAT	26	42	252	This work
Snf7 Xho1R	CTCGAGGCAAAGAAAAATGCGTCGAA	26	46		

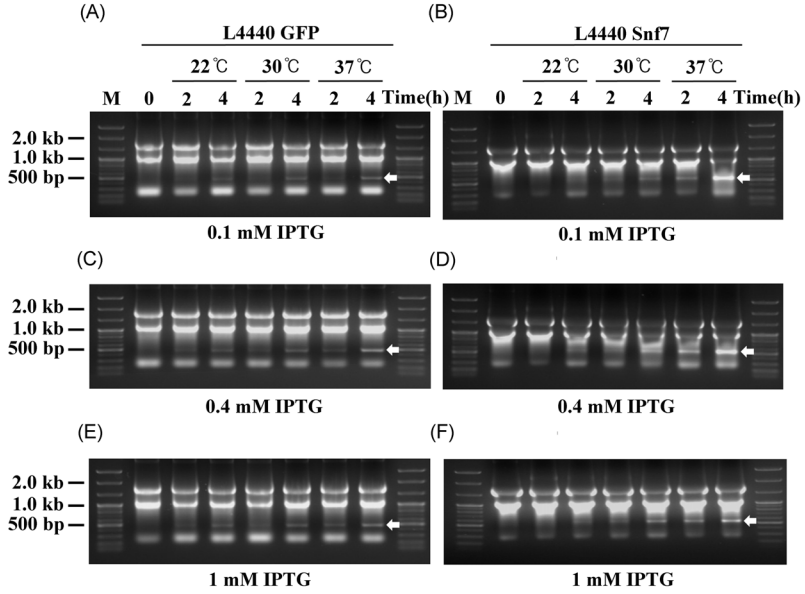

Fig. 3. Optimal induction condition of Snf7 dsRNA and GFP dsRNA. The dsRNA induction test in various IPTG concentrations, induction time and temperature. L4440 GFP and L4440 Snf7 transformed HT115 (DE3) with different IPTG concentration (A-B, 0.1 mM; C-D, 0.4 mM; E-F, 1 mM), induction time(2, 4 hour) and incubation temperature (22℃, 30℃, 37℃). Arrow indicated dsRNA band.

된 Snf7와 GFP의 발현을 비교해본 결과 37℃, 0.4 mM IPTG에서 Snf7과 GFP 모두 가장 많은 dsRNA가 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이 같은 발현조건 확립은 최대량의 dsRNA 추출물을 확보하기 위한 기본적인 요건으로 향후 dsRNA의 대량 발현을 위한 실험에 적용하면 고농도의 dsRNA를 정제하는 기준이 될 수 있다. 또한 본 연구에서도 이 같은 발현조건을 이용하여 dsRNA를 포함하는 total RNA를 분리하여 꿀벌 급성섭식독성평가 연구에 사용하였다.

대장균에서 분리한 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA가 48시간 급성섭식독성시험을 통해 꿀벌 성체에 유해성을 주는지 여부를 확인하기 위하여 사망개체수와 일반중독증상을 관찰하였다. 각각의 시험군에 무처리(25% 설탕용액), GFP dsRNA (1 μg/ml), Snf7 dsRNA (1 μg/ml)을 급이한 후 48시간 동안 관찰한 결과 시험물질에 의한 치사개체는 발견되지 않았다(Table 2). 또한 dsRNA 급성급이에 따른 일반 중독증상인 운동실조, 기능장애, 과민반응, 혼수, 빈사 등을 보이는지 관찰한 결과 이상증상을 보이는 꿀벌 개체는 관찰되지 않았다(Table 3). dsRNA가 목표한 유전자를 분해하기 위해서는 우선 서열이 일치하는 부위가 mRNA 부위여야 하며, 효과적으로 작용하기 위해서는 21~22 nt 크기의 dsRNA 여야

Table 2. Number of dead honey bees after dsRNA exposure

Nominal concentration (μg a.i/bee)	Number of Honey bee tested	Cumulative number of dead Honey bee			
		1 hour	4 hour	24 hour	48 hour
Assay Control	60	0	0	0	0
GFP	60	0	0	0	0
Snf7	60	0	0	0	0

Table 3. Symptoms of general intoxication of acute oral toxicity to adult honey bees with dsRNA treatment

Nominal concentration (μg a.i/bee)	Symptoms of general intoxication			
	1 hour	4 hour	24 hour	48 hour
Assay Control	N (60)	N (60)	N (60)	N (60)
GFP	N (60)	N (60)	N (60)	N (60)
Snf7	N (60)	N (60)	N (60)	N (60)

( ): Number of honey bee
* Abbreviation of observable symptoms of intoxication
N: Normal

Table 4. Blast results of honeybee genome to Snf7 sequence

Genomic Location	Overlapping Gene	Orientation	Length (mer)	Score	E-value	Identity (%)
15:2240755-2240782	GB54443	Forward	28	20	0.046	92.9
6:996087-996105		Forward	19	19	0.18	100.0
8:9822750-9822768	GB54818	Forward	19	19	0.18	100.0
GroupUn98:8202-8224		Reverse	23	19	0.18	95.7
7:1592493-1592514		Forward	22	18	0.72	95.5
2:12443904-12443921		Reverse	18	18	0.72	100.0
GroupUn10:63736-63757		Reverse	22	18	0.72	95.5
GroupUn106:41095-41116		Reverse	22	18	0.72	95.5
15:3706933-3706954	GB49490	Reverse	22	18	0.72	95.5
4:2993224-2993245		Forward	22	18	0.72	95.5
10:11029753-11029770		Forward	18	18	0.72	100.0
5:14182702-14182719		Reverse	18	18	0.72	100.0
11:1290363-1290379	GB43935	Reverse	17	17	2.8	100.0
11:7439654-7439670	GB47256	Forward	17	17	2.8	100.0
GroupUn121:12940-12956	GB45916	Forward	17	17	2.8	100.0
GroupUn1713:377-393		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn1624:9202-9218		Reverse	17	17	2.8	100.0
7:4249356-4249372	GB49246	Forward	17	17	2.8	100.0
2:2666985-2667001		Forward	17	17	2.8	100.0
1:6855091-6855107	GB40737	Reverse	17	17	2.8	100.0
1:22868151-22868167		Forward	17	17	2.8	100.0
GroupUn4315:178-194		Reverse	17	17	2.8	100.0
13:6204662-6204678		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn299:21884-21900		Reverse	17	17	2.8	100.0
6:17651796-17651816	GB55706	Reverse	21	17	2.8	95.2
GroupUn3912:3027-3043		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn337:40489-40505		Forward	17	17	2.8	100.0
9:5938018-5938034		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn4008:5044-5060		Reverse	17	17	2.8	100.0
12:1624966-1624982	GB40196	Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn3:266997-267013		Reverse	17	17	2.8	100.0
14:7055042-7055058		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn2563:826-842		Reverse	17	17	2.8	100.0
8:174565-174589	GB47875	Reverse	25	17	2.8	92.0
8:5608614-5608630		Forward	17	17	2.8	100.0
4:1062331-1062347	GB54885	Forward	17	17	2.8	100.0
4:9252465-9252481		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn477:2503-2519		Reverse	17	17	2.8	100.0
GroupUn3426:203-219		Forward	17	17	2.8	100.0
5:6470785-6470805		Forward	21	17	2.8	95.2
5:6697631-6697647		Forward	17	17	2.8	100.0
5:7735920-7735936	CALX	Forward	17	17	2.8	100.0

한다(Elbashir *et al.*, 2000). 공개된 Bioinformatic tool을 이용하여 Snf7 유전자 염기서열을 분석한 결과 dsRNA로 작용할 수 있는 염기서열은 존재하지 않았다(Table 4). Snf7 유전자 절편을 이용한 기존 유해성평가 연구에서 꿀벌 성충이 유해성을 보이지 않은 이유는 발현된 240 bp 의 Snf7 dsRNA와 일치하는 꿀벌의 유전자 염기서열이 게놈상에 존재하지 않으며, 작은 크기(17~19 nt)의 절편으로는 대상종인 꿀벌에 위해를 가할 수 없기 때문인 것으로 사료된다. 본 연구결과 HT115 (DE3)에서 분리정제한 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA도 꿀벌 성충에 대한 급성섭식 독성시험에서 유해성을 보이지 않았으며, 본 연구에 활용된 dsRNA 분리 방법 및 꿀벌 유해성평가 방법은 향후 dsRNA에 대한 꿀벌의 급성섭식독성 평가에 활용될 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 최근 RNAi 기반 LMO의 연구·개발이 활발히 진행됨에 따라 향후 이러한 기술을 이용한 LMO의 유해성 및 자연생태계 위해성평가가 필요할 때 실험실 수준에서 dsRNA를 대량으로 발현시키는 시스템을 확립하고, 수분(화분)매개 곤충인 꿀벌을 대상으로 유해성평가 시험을 수행하는 방법을 제시하고자 하였다. L4440 vector에 Snf7과 GFP 유전자를 클로닝한 plasmid를 HT115 (DE3) 대장균에 형질전환한 후 온도, 배양시간, IPTG 농도를 각기 다르게 하여 최적의 발현조건을 탐색한 결과 37℃, 0.4 mM IPTG, 4시간의 배양시간에서 가장 많은 양의 dsRNA가 발현됨을 확인하였다. 국내·외 제시된 꿀벌 위해성평가 가이드라인을 바탕으로 대장균에서 분리한 dsRNA를 꿀벌 성충에 급성섭식으로 처리한 결과 생사율과 일반중독증상에서 차이를 보이지 않는 것으로 보아 대장균으로부터 분리한 Snf7 dsRNA와 GFP dsRNA는 꿀벌 성충에 유해하지 않음을 알 수 있었다. 본 연구를 통해 dsRNA 물질의 유해성평가 및 자연생태계 위해성평가를 위한 대량 추출 방법과 위해성평가 대상종의 사육 및 물질 처리 방법을 확립하여 향후 이뤄질 dsRNA의 꿀벌 위해성평가에 활용될 것으로 사료된다.

Notes

The author declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This study was supported by the National Institute of Ecology (NIE), Republic of Korea.

References

Bautista, M. A. M., Miyata, T., Miura, K., & Tanaka, T. (2009). RNA interference mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamonback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resisitance to permethrin. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 39(1), 38-46.

Bachman, P. M., Bolognesi, R., Moar, W. J., Mueller, G. M., Paradise, M. S., Ramaseshadri, P., Tan, J., Uffman, J. P., Warren, J., Wiggins, B. E., & Levin, S. L. (2013). Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica vrigifera virgifera* LeConte). Transgenic Research, 22(6), 1207-1222.

Bettencourt, R., Terenius, O., & Faye, I. (2002). Hemolin gene silencing by dsRNA injected into *Cecropia pupae* is lethal to next generation embryos. Insect Molecular Biology ,11(3), 267-271.

Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., Mueller, G., Tan, J., Uffman, J., Wiggins, E., Heck, G., & Segers, G. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), PLoS One, 7(10), e47534.

Clifford, R. J., Milillo, M., Prestwood, J., Quintero, R., Zurawski, D. V., Kwak, Y. I., Waterman, P. E., Lesho, E. P., & Mc Gann, P. (2012). Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR, PLoS One, 7(11), e48558.

Coy, M. R., Sanscrainte, N. D., Chalaire, K. C., Inberg, A., Maayan, I., Glick, E., Paldi, N., & Becnel, J. J. (2012). Gene silencing in adult *Aedes aegypti* mosquitoes through oral delivery of double-stranded RNA. Journal of Applied Entomology, 136(10), 741-748.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2000). RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs. Genes & Development, 15, 188-200.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature, 391(6669), 806-811.

Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.-F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science, 336(6079), 348-350.

Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. Developmental Cell, 21(1), 77-91.

Jaubert-Possamai, S., Trionnaire, G. L., Bonhomme, J., Christophides, G. K., Rispe, C., & Tagu, D. (2007). Gene knockdown by RNAi in the pea aphid

Acyrthosiphon pisum. BMC Biotechnology, 7(1), 63-70.

Jeon, M. J., Seo, M. J., Youn, N. Y., & Yu, Y. M. (2014). RNA Interference of Chitinase gene in *Spodoptera litura*. The Korean Journal of Pesticide Science, 18(3), 202-209.

Kim, J. H., Seo, E. Y., Kim, J. K., Lim, H. S., Yu, Y. M., & Youn, Y. N. (2015). Gene expression in plant according to RNAi treatment of the tobacco whitefly. Korean Journal of Agricultural Science, 42(2), 81-86.

Koi, J., Ramaseshadri, P., Bolognesi, R., Segers, G., Flannagan, R., & Park, Y. (2014). Ultrastructural changes caused by Snf7 RNAi in larval enterocytes of western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte. PLoS One, 9(1), e83985.

Lima, P. C., Botwright, N. A., Harris, J. O. & Cook, M. (2014). Development of an *in vitro* Model System for Studying Bacterially Expressed dsRNA-Mediated Knockdown in *Neoparamoeba* genus. Marine Biotechnology, 16(4), 447-455.

Niimi, T., Kuwayama, H., & Yaginuma, T. (2005). Larval RNAi Applied to the Analysis of Postembryonic Development to the Analysis of Postembryonic Development in the Ladybird Beetle, *Harmonia axyridis*. Journal of Insect Biotechnology Sericology, 74(3), 95-102.

Quan, G., Ladd, T., Duan, J., Wen, F., Doucet, D., Cusson, M., & Krell, P. J. (2013). Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: Stage and tissue specific expression, and inhibition using RNA interference. Insect Biochemistry Molecular Biology, 43(8), 683-691.

Rajagopal, R., Sivakumar, S., Agrawal, N., Malhotra, P., & Bhatnagar, R. K. (2002). Silencing of midgut Aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Journal of Biological Chemistry, 277(49), 46849-46851.

Ramaseshadri, P., Segers, G., Flannagan, R., Wiggins, E., Clinton, W., Ilagan, O., McNulty, B., Clark, T., & Bolognesi, R. (2013). Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. PLoS One, 8(1), e54270.

Rodriguez-Cabrera, L., Trujillo-Bacallao, D., Borras-Hidalgo, O., Wright, D. J., & Ayra-Pardo, C. (2010). RNAi mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin like serine protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. Environmental Microbiology, 12(11), 2894- 2903.

Tan, J., Levine, S. L., Bachman, P. M., Jenson, P. D., Mueller, G. M. Uffman, J. P., Meng, C., Song, Z., Richards, K. B., & Beevers M. H. (2015) No impact of DvSnf7 RNA on honey bee (*Apis mellifera* L.) adults and larvae in dietary feeding tests. Environmental Toxicology and Chemistry, 35(2), 287-294.

Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce species and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Gene, 263(1), 103-112.

Turner, C. T., Davy, M. W., MacDiarmid, R. M., Plummer, K. M., Birch, N. P., & Newcomb, R. D. (2006). RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double- stranded RNA feeding. Insect Molecular Biology, 15(3), 383-391.

Vélez, A. M., Jurzenski, J., Matz, N., Zhou, X., Wang, H., Ellis, M., & Siegfried, B. D. (2016). Developing an *in vivo* toxicity assay for RNAi risk assessment in honey bees, *Apis mellifera* L. Chemosphere, 144, 1083-1090.

Wegner, C. S., Rodahl, L. M. W., & Stenmark, H. (2011). ESCRT proteins and cell signaling. Traffic, 12(10), 1291-1297.

Zhu, J. Q., Liu, S., Ma, Y., Zhang, J. Q., Qi, H. S., Wei, Z. J., Yao, Q., Zhang W. Q., & Li, Z. (2012). Improvement of Pest Resistance in Transgenic Tobacco Plants Expressing dsRNA of an Insect-Associated Gene EcR. PLoS One, 7(6), e38572.