

소나무재선충(*Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle)의 GaLectin에 대한 특이적인 단클론 항체 제작과 진단에의 활용

김아영^{1†} · 김영하^{1,2†} · 최보혜^{1,2} · 트랑뉴젠^{1,2} · 윤경재^{3,4} · 이시혁^{3,4} · 한혜림^{5*} · 고영호^{1,2*}

¹한림대학교 일송생명과학연구소, ²한림대학교 노화생명과학과, ³서울대학교 농생물학과, ⁴서울대학교 농생명과학연구원, ⁵국립산림과학원

Development of Monoclonal Antibodies Specific to Galectin of Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle and Their Utilization for Detection of Pine Wood Nematodes

A-Young Kim^{1†}, Young Ha Kim^{1,2†}, Bo-Hye Choi^{1,2}, Trang Nguyen^{1,2}, Kyungjae Andrew Yoon^{3,4}, Si Hyeock Lee^{3,4}, Hye-Rim Han^{5*} and Young Ho Koh^{1,2*}

¹Ilsong Institute of Life Science, Hallym University, Anyang 14066, Korea

²Department of Biomedical Gerontology, Hallym University, Chuncheon 24252, Korea

³Department of Agricultural Biology, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

⁴Research Institute of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

⁵Laboratory of Pine Wilt Disease, Division of Forest Insect Pests & Disease, National Institute of Forest Science, Seoul 02455, Korea

ABSTRACT: Currently, there is no available tool that rapidly diagnoses pine wood nematode (PWN)-infected pine trees in the field. In this study, we synthesized and purified PWN Galectin, which might be an antigen specific to PWN, using the Baculovirus expression system. We used PWN Galectin as an antigen for generating 1,464 fusion hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies (Mabs). Among them, we selected 62 fusion hybridoma cell lines showing high reactivity to PWN Galectin. We further selected 12 fusion hybridoma cell lines showing high reactivity to the standard PWN-infected pine tree phosphate buffered saline (PBS) extract. Additionally, two fusion hybridoma cell lines showing no or extremely low reactivity were used as controls. The selected fusion hybridoma cell lines were subjected to limiting dilutions for selecting and establishing Mab-secreting cell lines showing higher reactivity to the standard PWN-infected pine tree extract than to the standard normal pine tree PBS extract. Moreover, the selected fusion hybridoma cell lines were further selected based on their higher reactivity to PWN protein extracts than to three non-pathogenic nematode protein extracts. The Mab-secreting cell lines established in this study could be used to develop rapid diagnostic tools that can be used in the field or in laboratories for detecting PWN-infected pine trees or PWN.

Key words: Pine wood nematode, Galectin, Infected pine tree, Non-pathogenic pine tree, Mab-secreting cell line

조 록: 소나무재선충(pine wood nematode, PWN) 감염 소나무를 현장에서 신속하게 진단을 할 수 있는 방법은 현재 없다. 본 연구에서는 PWN 특이적인 항원으로 알려진 PWN-GaLectin을 baculovirus 발현체계로 발현시켜서 총 1,464개의 fusion hybridoma 세포 주 라이브러리를 제작 하는 항원으로 이용하였다. 총 1,464개의 fusion hybridoma 세포 주 중, PWN-GaLectin에 대한 높은 반응을 보이는 62개의 fusion hybridoma 세포 주를 선별했다. 이들 중, 표준 PWN 감염소나무 PBS추출물과 PWN 단백질 추출물에 강한 반응을 보이는 세포 주 12개를 선별하여 단클론 항체(monoclonal antibody, Mab) 분비세포 주 확립을 위한 limited dilution을 실시하였다. Mab분비세포 주 확립을 위해서 표준 PWN 감염소나무 추출물에 대한 반응이 표준 정상 소나무 추출물 보다 높은 세포 주들을 선별했다. 그리고 추가로 PWN 단백질 추출물에 대해서 3종의 비 병원성 선충 단백질 추출물 보다 높은 반응을 보이는 세포 주들도 선별, 확립했다. 본 연구에서 확립된 Mab들을 우리는 현장과 실험실에서 사용할 수 있는 신속진단키트의 개발에 이용할 수 있을 것이다.

검색어: 소나무재선충, GaLectin, 감염소나무, 비병원성 선충, Mab분비세포 주

*Corresponding author: hrhan123@korea.kr, kohyh@hallym.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

Received October 24 2017; Revised November 14 2017

Accepted January 16 2018

소나무재선충병(Pine wilt diseases, PWN)은 소나무재선충(pine wood nematode, PWN; *Bursaphelenchus xylophilus*)의 감염에 의하여 발병하여 소나무를 단 기간 내에 고사를 시켜 산림 생태계를 파괴하는 현재 가장 심각한 산림병해충 질환이다(Futai, 2013). 솔수염하늘소속(*Monochamus*)에 속하는 하늘소들이 매개충으로 PWN을 감염목에서 건전한 소나무로 전염시킨다고 알려져 있다(Futai, 2013; Zhao et al., 2014). 솔수염하늘소속 하늘소 중에서 솔수염하늘소(*Monochamus alternatus*)와 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)가 PWN 감염으로 고사된 소나무에 산란을 하면, 유충은 고사목 안에서 발육을 하여 다음 해에 성충으로 우화를 한다(Kim et al., 2009). 우화된 성충의 경우는 PWN을 많게는 20,000마리까지 보유를 하고 있다(Kim et al., 2009). 봄에 우화된 하늘소 성충은 성적인 성숙과 생존을 위하여 건전한 소나무의 가지를 섭식하는데, PWN은 이 때 하늘소에서 나와서 하늘소가 섭식하면서 생긴 상처를 통해서 건전한 소나무에 침입을 한다. 소나무에 침입한 PWN은 소나무 조직을 분해하는 다양한 종류의 효소들을 분비하여 성장과 증식에 필요한 영양분으로 사용을 한다고 알려져 있다(Futai, 2013).

최근에 소나무 추출물에 PWN을 배양한 후, 분비되는 분비 단백질체(secretome)를 분석한 연구는 PWN이 분비하는 다양한 종류의 식물 세포벽이나 조직을 파괴하는 효소들을 밝혀냈다(Shinya et al., 2013). 하지만, 아직까지 소나무에 침입한 PWN이 분비하는 효소나 단백질들에 대한 구명연구는 보고된 바 없어서, PWN이 건전 소나무 추출물에 반응하여 분비하는 효소나 단백질들에 대한 검증연구가 필요한 실정이다.

우리는 PWN의 GaLectin에 대한 특이적인 단클론 항체를(Monoclonal antibody, Mab) PWN의 추출물을 항원으로 이용하여 제작된 Mab 라이브러리에서 찾아내 보고하였다(Lee et al., 2011). GaLectin은 미생물과 진균의 세포벽 그리고 동물 세포의 구조의 주 구성요소 중 하나인 Peptidoglycan의 주요성분인 N-acetylglucosamine을 분해하는 효소다(Barondes et al., 1994). 본 연구에서는 PWN의 GaLectin에 대한 단클론 항체 라이브러리를 제작한 후, 표준 PWN 감염 소나무 phosphate buffered saline (PBS) 추출물과 PWN 단백질 추출물에 높은 반응을 보이는 Mab 분비 세포주를 발굴하고 확립했다.

재료 및 방법

PWN GaLectin cDNA 확보 및 클로닝

PWN GaLectin의 signal peptide를 제외한 분비되는 단백질의 cDNA를 정방향 primer (5'-GAATCTAGAATGACTGAG

GAAAAGAAAACCTTACAC-3')와 역방향 primer (5'-CTTG GTACCATGGATCTGGATGCCAGTGATC-3')를 이용하여 834 bp PCR 산물을 증폭을 한 후, pBacPAK8 발현 vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA)에 cloning을 하였다. GaLectin 유전자를 포함하는 pBacPAK8-GaLectin plasmid를 내재하는 *E. coli*를 선별하여 배양을 한 후, plasmid miniprep kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 pBacPAK8-GaLectin plasmid를 확보하였다.

Baculovirus 발현체계를 이용한 발현 및 정제

BacPAKTM Baculovirus Expression System (Clontech, Palo Alto, CA, USA)을 이용하여 제조사의 방법을 따라 발현했다. 우선 FBS가 혼합되지 않은 TC-100 media (WelGene, Gyeongsan, Korea) 1 ml에 5.0×10^4 cells/ml 단위의 Sf9 cell을 접종하여 30분간 안착시켰다. 그리고, pBacPAK8-GaLectin plasmid DNA와 pBacPAK6 viral DNA와 Bacfectin (Clontech)을 혼합한 후 25°C에서 15분간 유지한 후, Sf9 cell의 형질전환을 위하여 안정화된 Sf9 cell들에 2개의 DNA들과 Bacfectin 혼합물을 접종한 후 25°C에서 5시간동안 1차 배양했다. 그 후 10% FBS가 첨가된 TC-100 media 1 ml을 추가 접종 한 후 5-7일 동안 27°C 세포배양기에서 배양했다. 배양 후, 세포들을 부유상태로 만들어 수확한 후, 6,000 rpm에서 5분간 원심분리를 진행하여 Virus stock인 상층액을 회수했다. 회수된 상층액 500 µl를 10 ml (5.0×10^6 cells/ml Sf9)에 접종을 하여 3~5일간 배양했다. 배양된 세포는 부유상태로 만들어 회수를 한 후 3,300 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 cells을 Lysis buffer에 녹여 Branson Sonifier (Branson Sonifier, Danbury, CT, USA)로 세포를 파괴하고 12,000 × g에서 10분간 원심분리 후 상층액을 회수했다. 발현된 GaLectin의 정제는 AKTAprius plus (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)에 HisTrap HP column (GE Healthcare)을 이용하여 정제했다. 단백질 용출 시 피크가 나타나는 분획을 모은 후에 Amicon Ultra Centrifugal filter tube (Merck Millipore, Temecular, CA, USA)를 이용하여 농축했다.

단 클론 항체 제작

본 연구는 한림대학교 동물윤리 위원회의 승인(No. HMC 2017-00431-7)을 받고, 정제된 GaLectin을 항원으로 이용하여 단클론 항체를 이전에 발표한 방법에 따라서 진행을 했다(Lee et al., 2011). 총 4마리의 Balb/C 생쥐에 항원을 주사한 후에 총 1,464개의 fusion hybridoma cell lines을 제작한 후, 항원을 이

용하여 enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA)를 수행하여 항원에 대한 반응성이 높은 62개의 세포 주를 선별했다 (미보고 자료).

PWN 감염목, 건전 소나무 추출물제조 방법

Kim et al. (2017)에서 보고한 소나무들과 추출방법을 사용했다. 간단히 설명을 하면, 생리식염수(phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2, 0.01 M Na₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)를 이용하여 77개의 PWN 감염 소나무와 22개의 건전소나무의 목편에서 단백질들을 포함한 다양한 수용성물질을 추출했다. 77개의 PWN 감염 소나무 PBS추출액을 합쳐 표준 PWN감염 소나무 PBS추출물로 사용을 하였고 22개의 정상 소나무 PBS추출액을 합쳐서 표준 정상 소나무 PBS추출물로 사용을 하였다.

PWN과 3종의 부식성 선충의 단백질 추출방법

PWN과 3종의 부식성 선충(*Bursaphelenchus doui*, *B. muscronatus*, *B. thailandae*)을 이전에 보고한 방법으로 배양했다(Lee et al., 2011). 선충들은 Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 넣은 RIPA buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 균질화시킨 후, 상층액을 침전물에서 분리하기 위하여 냉장된 원심분리기를 이용 13,000 rpm에서 15분간 회전시켰다. 상층액의 단백질을 농도를 BCA방법(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량한 후 10 ng/ml의 농도로 ELSIA의 항원으로 사용 했다.

ELSIA 수행방법

항원을 coating 용액(0.4 M carbonate buffer, pH 9.6)에 섞어서 농도를 맞춘 후에, 96 well plate (SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에 일정량을 분주한 후, 피막을 형성시키기 위하여 37°C에서 2시간 보관했다. 세척용액(0.01 M PBS + 0.05% Tween 20)으로 3회 세척 후, 비 특이적인 반응을 억제하기 위하여 blocking용액(세척용액 + 0.25% BSA)을 처리한 후, Mab를 넣어주고 4°C에서 밤새 보관했다. 세척용액으로 3회 세척 후에 1:5,000으로 희석된 2차항체(HRP-conjugated anti-mouse-Mab antibody, ThermoFischer)를 96 well plate에 분주한 후 상온에서 1시간 동안 교반했다. 세척용액으로 3회 세척 후에 TMB solution (Sigma-Aldrich)을 넣어 준 후 상온에서 30분간 교반/

반응시킨 후 2 M sulfuric acid (DaeJung Chemicals & Metals, Siheung, Korea)를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 Epoch microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)을 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

ELISA를 이용한 표준 PWN 감염목 PBS추출물과 PWN RIPA추출물에 높은 반응성을 보이는 fusion hybridoma 선별

표준 PWN 감염목 PBS추출물과 PWN RIPA추출물을 각각 coating 용액에 섞어서 농도를 보정한 후, 위에 언급된 방법으로 ELISA를 수행하여 흡광도를 측정했다. 흡광도가 높은 12개의 fusion hybridoma 세포 주들과 흡광도가 0이거나 매우 낮은 2개의 fusion hybridoma세포 주들을 선별했다.

단클론 항체 세포 주 확립을 위한 limited dilution방법

단클론항체라인을 확립하기 위하여 14개의 fusion hybridoma cell lines들을 96 well plate에 분주했다. 분주된 96 well plate의 30~70% 정도의 well만이 세포를 하나 정도 가지도록 limited dilution을 수행한 후, 37°C CO₂ incubator에서 배양했다. 세포의 증식에 따른 Mab의 분비가 확인이 되면, 상층액을 이용하여 ELISA를 수행하여 높은 보정된 반응성을 가지는 Mab분비세포 주를 확립했다.

ELISA를 이용한 표준 건전 소나무 PBS추출물대비 표준 PWN 감염 소나무 PBS추출물에 높은 보정된 반응성을 가지는 Mab분비세포주 확립

표준 PWN 감염 소나무 PBS추출물에 높은 반응성을 가지는 Mab분비 단클론 세포 주를 확립하기 위하여 각각의 limited dilution된 Mab분비세포들에 대한 보정된 반응성(normalized reactivity)을 아래 계산식을 이용하여 산출했다.

$$\text{보정된 반응성} = (\text{표준 PWN 감염 소나무 PBS 추출물의 흡광도} - \text{표준 정상 소나무 PBS추출물의 흡광도}) / \text{표준 정상 소나무 PBS추출물의 흡광도}$$

높은 보정된 반응성을 보이는 세포 주를 증식하여 단클론 항체 분비세포 주를 확립했다.

ELISA를 이용한 3종의 비 병원성 선충 보다 PWN RIPA 추출물에 높은 보정된 반응성을 보이는 Mab 분비세포 주 확립

PWN RIPA추출물에 높은 반응성을 보이는 Mab분비 단클론 항체 세포 주를 확립하기 위하여 각각의 limited dilution된 Mab분비세포들에 대한 보정된 반응성을 아래 계산식을 이용하여 산출했다.

$$\text{보정된 반응성} = (\text{PWN RIPA 추출물의 흡광도} - \text{비병원성 선충 3종의 RIPA추출물의 흡광도}) / \text{비병원성 선충 3종의 RIPA추출물의 흡광도}$$

높은 보정된 반응성을 보이는 세포 주를 증식하여 단클론 항체 분비세포 주를 확립했다.

결 과

Baculovirus발현 체계를 이용한 Mab제작을 위한 GaLectin 발현 및 정제

우리는 이전 연구에서 발견한 PWN특이 Mab의 항원이 GaLectin임을 보고하였다(Lee et al., 2011). 본 연구에서는 PWN 감염목의 진단에 활용을 할 수 있는 Mab를 제작하기 위하여 PWN이 소나무에 침입하고 증식할 때 분비할 것으로 예측되는 GaLectin을 Baculovirus 발현 체계를 이용하여 발현, 정제, 농축을 진행 하였다(Fig. 1). pBacPAK8-GaLectin plasmid로 형질 전환되기 전의 Sf9세포와 비교해서 형질 전환된 Sf9 세포의 경우 2일 후부터 33 kDa 크기의 밴드가 명확하게 관찰이 되었다. 그리고, HisTrap column을 이용하여 발현이 증가된 33 kDa 크기의 GaLectin 단백질질을 분리해낼 수 있었다.

62개의 GaLectin에 높은 반응성을 보이는 fusion hybridoma 세포 주들의 표준 소나무 감염목 PBS추출물과 PWN RIPA 추출물에 대한 반응성

우리는 총 1,464개의 fusion hybridoma cell line들이 분비하는 Mab들의 항원인 GaLectin에 대한 반응성을 검색하여 상위 62개의 세포 주를 선별했다(미보고 자료). 선별된 62개의 세포 주들의 Mab들을 표준 PWN 감염목 PBS추출물 또는 PWN PBS추출물을 이용하여 이들에 대해서 높은 특이적인 반응성을 보이는 fusion hybridoma 세포 주 12개와 전혀 반응성이 없거나

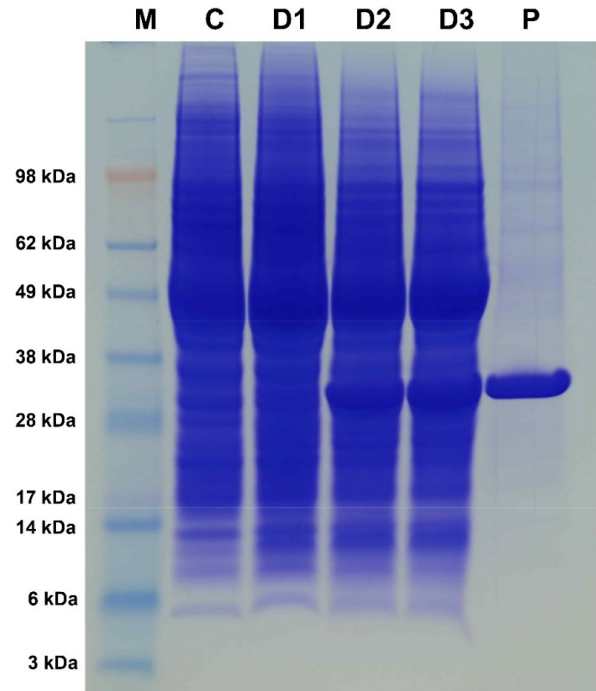


Fig. 1. Expression and purification of Galectin by baculovirus system. After incubation for 2 days, Galectin-specific bands were obtained from cell lysates. M, molecular maker; C, control protein extract from Sf9 cells before transfection; D1, protein extract from Sf9 cells infected with pBacPAK8-Galectin plasmids and grown for 1 day; D2, protein extract from Sf9 cells infected with pBacPAK8-Galectin plasmids and grown for 2 days; D3, protein extract from Sf9 cells infected with pBacPAK8-Galectin plasmids and grown for 3 days; P, Galectin proteins purified with a HisTrap column.

낮은 세포 주 2개를 대조군으로 선별하여 사용 하였다(Fig. 2). 선별된 14개의 fusion hybridoma cell line중 3G11, 2D1, 4A4, 4B12, 15D6, 16F6, 12G4, 8H5 등 총 9개의 세포주는 표준 PWN 감염목 PBS추출물에 높은 반응성을, 9A9세포주는 PWN PBS추출물에 높은 반응성을, 그리고 14G4와 16D7의 경우는 두 가지 항원에 비슷한 정도의 반응성을 보였다(Fig. 2). 그리고 2B7과 12D2의 경우는 반응성이 없거나 낮은 대조군 세포 주로 이용 하였다.

선별된 12개의 세포 주에 대한 Limited dilution을 통한 Mab분비 세포 주 제작 및 확립

Mab 세포 주를 확립하기 위하여 우리는 위에 선별된 14개의 fusion hybridoma cell lines에 대한 limited dilution을 수행하여 하나의 세포 주를 96 well 중 30~70%의 well만이 하나 이상의 세포를 가지고 있게 분주를 한 후 배양했다. 96 well plate에서 Mab를 포함하고 있는 배양액을 회수 하여 우선 표준 PWN 감염 소나무 PBS추출물과 표준 건전 소나무 PBS추출물을 이용

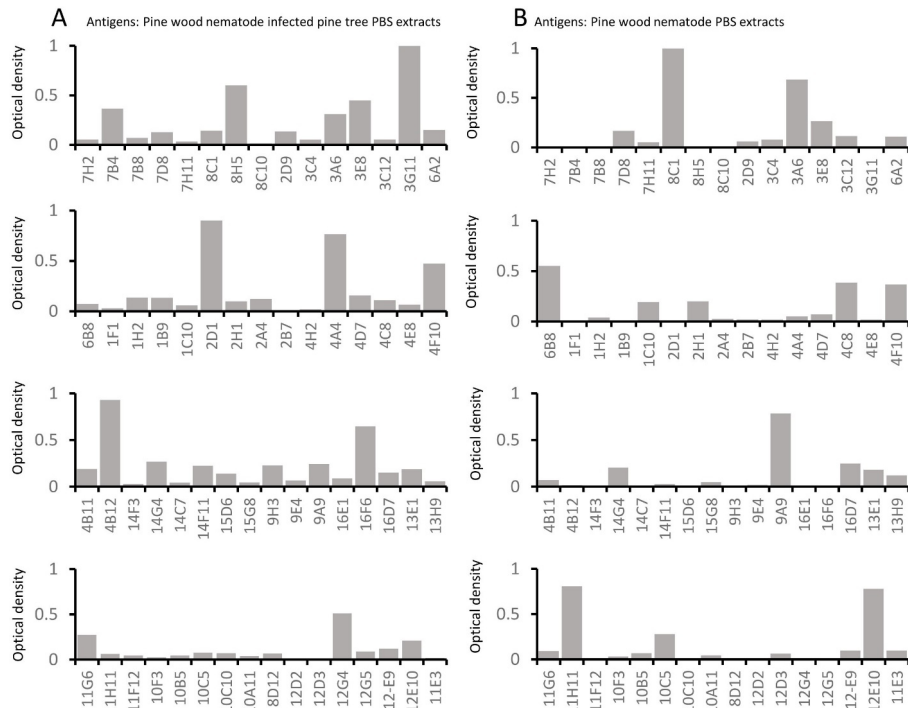


Fig. 2. Screening of 62 hybridoma cell lines against PWN-positive sample using ELISA. A, The optical densities (OD) of crude antibodies from 62 hybridoma cell lines were measured using PWN-infected pine tree PBS extracts as antigens; B, The OD of crude antibodies from 62 hybridoma cell lines were measured using PWN-PBS extracts as antigens. This experiment was repeated thrice per antibody.

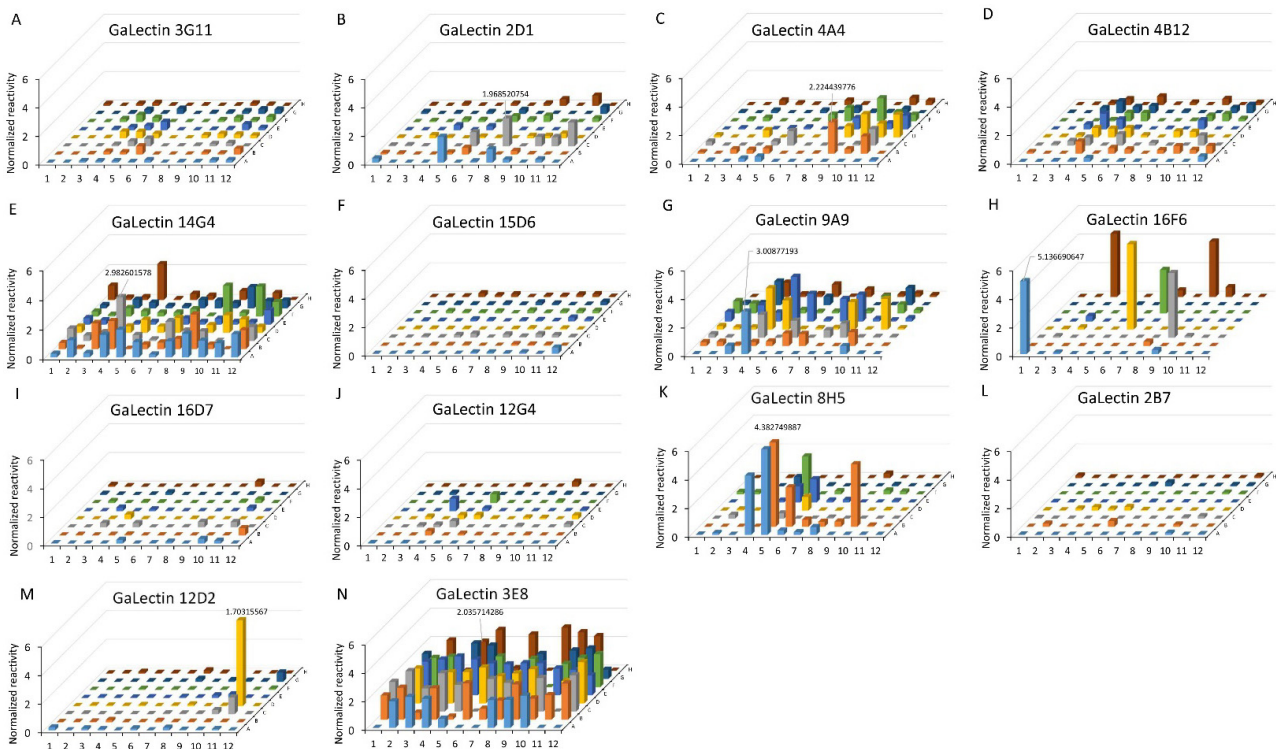


Fig. 3. Normalized immunoreactivity of limiting-diluted fusion hybridoma cell lines. (A-N) Fourteen fusion hybridoma cell lines were limiting-diluted and screened for identifying the monoclonal hybridoma lines secreting monoclonal antibodies (Mabs) for higher immunoreactivity to the standard PWN-infected pine tree PBS extract than the standard normal pine tree PBS extracts.

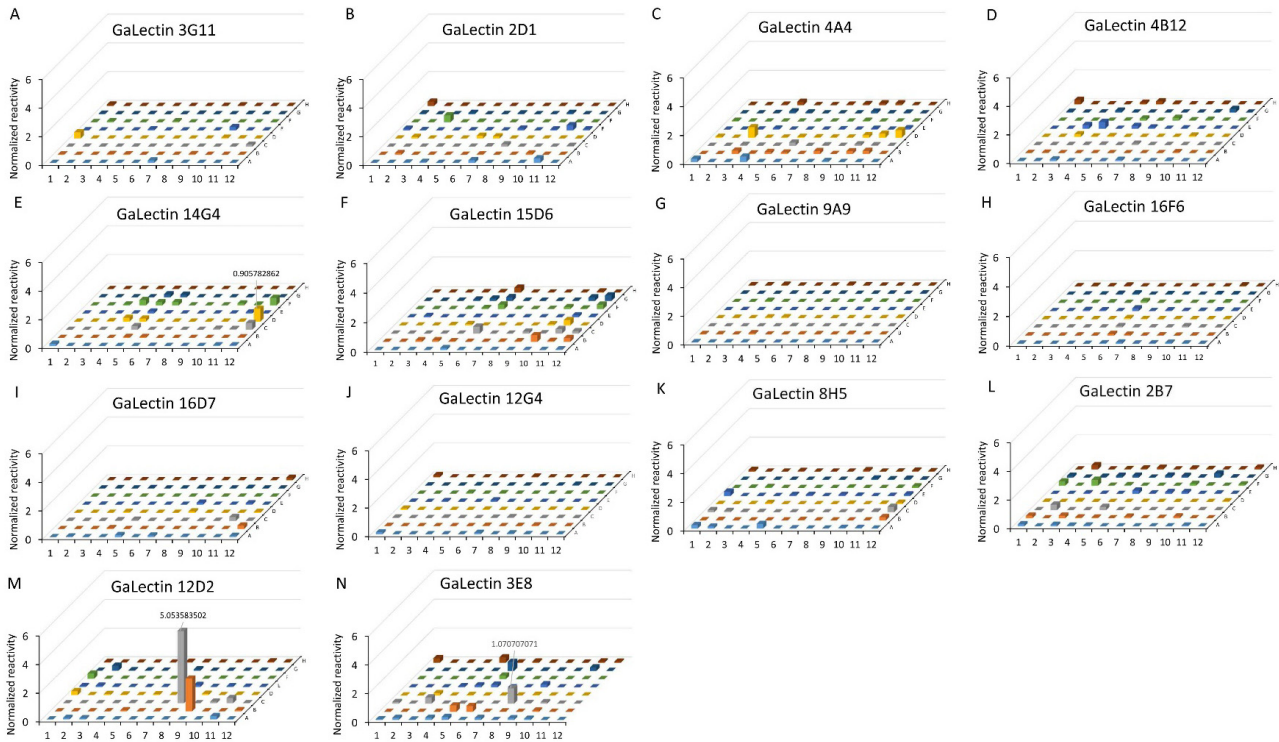


Fig. 4. The same limiting-diluted fusion hybridoma cell lines as shown in Fig. 3 were screened for identifying the clones secreting Mabs with higher immunoreactivity to the *B. xylophilus* protein extracts than protein extracts of the other three non-pathogenic nematodes.

하여 ELISA를 수행한 후에 보정된 반응성을 계산하여 높은 반응성을 보이는 세포 주들을 확인했다.

Limited diluted된 Mab 분비 세포 중에서 표준 PWN 감염 소나무 추출물에 대한 normalized reactivity가 높게 나오는 세포 주로는 3E8 (Fig. 3N), 9A9 (Fig. 3G), 16F6 (Fig. 3H), 8H5 (Fig. 3K), 14G4 (Fig. 3E)등 이었다. 그리고 limited diluted된 Mab 분비 세포 주에서 PWN PBS추출물에 대한 normalized reactivity가 높게 나오는 세포 주는 12D2 (Fig. 4M), 3E8 (Fig. 4N), 14G4 (Fig. 4E)등 이었다. 그리고 동일한 fusion hybridoma 세포 주에서 limited diluted된 Mab세포 주 간에도 2가지 물질들에 대한 반응성의 차이가 크게 존재를 하고 있었다. 이 결과는 fusion hybridoma 세포 주들은 다른 epitope를 인식하는 Mab 분비세포들이 2개 이상 섞여 있는 다 클론 상태를 말해 주고 있다.

고찰

PWN에 감염된 원목이나 가공된 목재의 이동이 재선충병 확산의 가장 주요한 원인으로 알려져 있다(Futai, 2013; Zhao et al., 2014). 그러므로, PWN이 소나무 안에 존재를 하는지를 확인하는 기술 개발이 필요하다. 현재까지의 연구와 개발은 PWN

유전자를 이용한 DNA 진단방법의 개발에 중점을 두어왔다. 그 이유는 DNA 수준에서 숙주인 소나무와 PWN 사이에는 커다란 차이가 존재를 하여, 일반적인 PCR방법(Kang et al., 2004)이나 real-time PCR (RT-PCR) 방법(Cao et al., 2005)을 활용하면, 정확하게 진단을 할 수 있기 때문이다. 하지만, 이러한 PCR을 이용한 진단방법은 여러 가지 단점을 가지고 있다. 첫 번째 단점은 PWN감염의심 소나무로부터 DNA를 추출한 후에, PCR이나 RT-PCR기계를 이용하여 실험을 진행해야 하므로 PWN 감염이 의심되는 소나무가 존재하는 산림포장에서는 진행을 하기 어렵다. 두 번째 단점은 PCR이나 RT-PCR의 경우, 반응시간도 2시간 이상이 걸리고(Cao et al., 2005; Kang et al., 2004), 정확한 결과를 위해서는 실험자가 DNA추출과 PCR실험 설정에 오류를 범하지 않을 정도로 숙련된 훈련이 필요하다. 최근에 들어서 PCR이나 RT-PCR이 가지는 단점 중의 일부를 극복할 수 있는 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)을 이용한 PWN의 진단방법이 개발되어 보고되었다(Kang et al., 2015; Kikuchi et al., 2009). 등온증폭법은 일반 PCR이나 RT-PCR과 같이 고가의 기계가 필요 없이 55~65°C 사이를 등온으로 유지시켜주는 항온수조나 항온기만 있으면 된다는 장점이 있다(Notomi et al., 2000). 하지만, 다른 PCR법과 같이 선충의 DNA를 필요로 하고, 등온증폭법의 경우도 최소 30분에

서 1시간의 반응시간을 필요하다는 단점이 존재를 한다(Kang et al., 2015; Kikuchi et al., 2009).

이러한 DNA기반 진단 방법에 비하여 특이적인 항원에 대한 단클론 항체를 이용한 신속진단 키트는 첫째, 10~15분 이내에 빠른 시간에 진단이 가능하고, 둘째, 여러 개의 항원에 대한 동시 분석이 가능하고, 셋째, 대량 생산 시 단가가 매우 낮아진다는 장점이 있다(Koczula and Gallotta, 2016). 하지만, 특이적인 항원이 알려지지 않은 경우는 이에 대한 기초 연구가 필요하고, 하나의 항원에 대해서 다른 epitope을 가지는 두 개의 Mab가 필요하다는 단점이 있다.

본 연구에서 GaLectin을 항원으로 선택한 이유는 이전의 PWN의 단백질 추출물에 대한 단클론 항체 library에서 발견된 PWN 특이 항체의 항원이 GaLectin이었고(Lee et al., 2011), PWN의 주요한 먹이 중의 하나가 진균류인데(Futai, 2013; Zhao et al., 2014) 고산된 소나무에는 다양한 진균류가 자라므로 재선충들은 이들을 먹이로 이용하기 위해서는 GaLectin의 발현과 분비가 필요할 것이다. 본 연구에서는 GaLectin의 분비되는 형태와 가장 비슷한 단백질을 항원으로 하여 PWN감염 소나무 추출물과 PWN 단백질 추출물에 반응하는 10개 이상의 Mab분비 세포주를 확보하였고, 그들의 특이성을 알아냈다. 그러므로, 본 연구에서 확보한 Mab들은 PWN감염 소나무를 알아내는데 사용될 수 있는 신속진단키트의 제작과 PWN과 다른 비병원성 선충을 분별하는데 사용될 수 있는 신속진단키트의 제작에 활용될 수 있을 것이다. 그리고, 향후 이들을 활용할 실용화 연구는 현재까지 없었던 신속진단키트의 제작을 가능케 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 산림과학원의 지원으로 이루어 졌음(소나무재선충 중 특이 항원 및 항체를 이용한 진단 기술 개발 No. 12178-0279-01).

Literature Cited

Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Leffler, H., 1994. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269, 20807-20810.

Cao, A.X., Liu, X.Z., Zhu, S.F., B.S., L., 2005. Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 95, 566-571.

Futai, K., 2013. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 61-83.

Kang, J.S., Choi, K.S., Shin, S.C., Moon, I.S., Lee, S.G., Lee, S.H., 2004. Development of an efficient PCR-based diagnosis protocol for the identification of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). *Nematology* 6, 279-285.

Kang, J.S., Kim, A.-Y., Han, H.R., Moon, Y.S., Koh, Y.H., 2015. Development of two alternative loop-mediated isothermal amplification tools for detecting pathogenic pine wood nematodes. *For. Pathol.* 45, 127-133.

Kikuchi, T., Aikawa, T., Oeda, Y., Karim, N., Kanzaki, N., 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology* 99, 1365-1369.

Kim, D.S., Lee, S.M., Hur, H.S., Park, C.N., Park, J.G., 2009. Escape of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, through feeding and oviposition behavior of *Monochamus alternatus* and *M. saltuarius* (coleoptera: cerambycidae) adults. *Korean J. Appl. Entomol.* 48, 527-533.

Kim, Y.H., Kim, A.-Y., Choi, B.-H., Han, H.-R., Koh, Y.H., 2017. ExpansinB3 as a marker for detecting pine wood nematode-infected pine trees. *J. Asia-Pacific Entomol.* 20, 1228-1233.

Koczula, K.M., Gallotta, A., 2016. Lateral flow assays. *Essays Biochem.* 60, 111-120.

Lee, D.-W., Seo, J.B., Nam, M.H., Kang, J.S., Kim, S.Y., Kim, A.-Y., Kim, W.T., Choi, J.K., Um, Y., Lee, Y., Moon, I.-S., Han, H.R., Koh, S.-H., Je, Y.H., Lim, K.J., Lee, S.H., Koh, Y.H., 2011. A combination of biochemical and proteomic analyses reveals Bx-LEC-1 as an antigenic target for the monoclonal antibody 3-2A7-2H5-D9-F10 specific to the pine wood nematode. *Mol. Cell Proteomics* 10, M900521-MCP900200-900521.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28, e63.

Shinya, R., Morisaka, H., Kikuchi, T., Takeuchi, Y., Ueda, M., Futai, K., 2013. Secretome analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* reveals the tangled roots of parasitism and its potential for molecular mimicry. *PLoS One* 8, e67377.

Zhao, L., Mota, M., Vieira, P., Butcher, R.A., Sun, J., 2014. Interspecific communication between pinewood nematode, its insect vector, and associated microbes. *Trends Parasitol.* 30, 299-308.