

초고속 유전자 증폭법을 이용한 서양뒤영벌 의심병원체 *Lysinibacillus fusiformis*의 신속 검출법

김소민 · 임수진 · 김정민 · 김병희 · Truong A Tai · 윤병수*

경기대학교 이공대학 생명과학과

Rapid Detection for *Lysinibacillus fusiformis*, a Suspicious Pathogen of *Bombus terrestris*, using Ultra-Rapid PCR

Somin Kim, Sujin Lim, Jungmin Kim, Byounghee Kim, Truong A Tai and Byoungsu Yoon*

Department of Life Science, College of Science and Engineering, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea

(Received 10 September 2017; Revised 26 September 2017; Accepted 26 September 2017)

Abstract

Lysinibacillus fusiformis has been suspected to be a pathogen of *Bombus terrestris* in Korea since 2008. In this study, we developed the rapid detection method for the *L. fusiformis* by utilizing the Ultra-rapid PCR. After optimizing of *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR, it can detect the existence of 1.0×10^8 *L. fusiformis*-specific DNA molecules in 4 minute and 22 seconds. Even, only 10 molecules could be detected quantitatively using this method. In addition, for the first time, in our knowledge, *L. fusiformis* was detected using proposed method from bumblebee produced commercially in Korea. Not only in the laboratory but also in the field, *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR would be applied and might be expected as convenient tools at production of bumblebee or inspection for the import and export of bumblebee.

Key words: *Lysinibacillus fusiformis*, Bumblebee, *Bombus terrestris*, Ultra-rapid PCR, Rapid detection

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 *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 보

*Corresponding author. E-mail: bsyoon@kyonggi.ac.kr

고되고 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 분리된 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 감염되는 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 바가 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 관련된 자료조차 찾기 어려웠다.

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

여주었다(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 판매되고있는 화분매개용 뒤영벌 사체에서 병원체의 존재여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

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.

뒤영벌 시료 확보 및 genomic DNA의 추출

뒤영벌 시료는 2016년 8월 경기도 수원, 전라도 보성, 경상남도 창원, 경상북도 청송에서 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°C에서 5분간 끓여준 뒤, 상기 kit의 gDNA

Table 1. *Lysinibacillus fusiformis* specific primers

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

분리 방법을 적용하였다. 추출된 Total gDNA를 spectrophotometer로 정량하고, -70°C 에 보관하며 이후 실험에 사용하였다.

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)를 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).

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 GENE CHECKER (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 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ 범위에서 구하였으며, 최적의 primer 농도는 $10\mu\text{M}$, $8\mu\text{M}$, $4\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $0.5\mu\text{M}$, $0.25\mu\text{M}$ 에서 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.

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 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.

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 $5\mu\text{l}$ 의 $2 \times$ Rapi master mix와 $1\mu\text{l}$ 씩의 *L. fusi* detection F2/R2(최종 농도 $4\mu\text{M}$) 프라이머에 *L. fusiformis* gDNA(최고 50ng 에서 최저 1ng 까지 희석)을 첨가하여 총 $10\mu\text{l}$ 로 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°C 초기 변성 15초 후, 95°C 변성 1초, 57°C 혼성 2초, 72°C 중합 2초를 표준으로 하였고, 총 50 회전을 진행하였다.

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

국내에 판매되고 있는 서양뒤영벌의 *L. fusiformis* 감염 여부를 판단하기 위하여, 경기도 수원, 전라도 보성, 경상남도 창원, 경상북도 청송에서 생산된 뒤영벌 각 1마리에 대하여 gDNA를 분리하였다. gDNA는 각

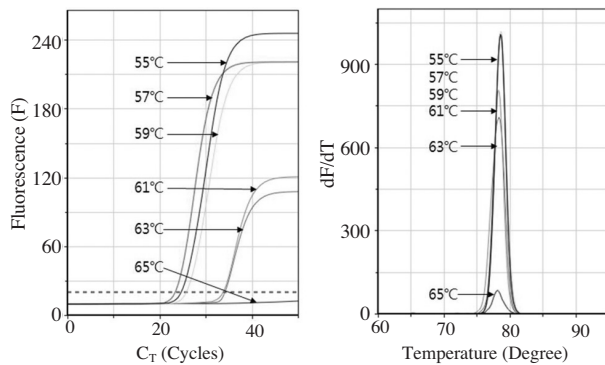


Fig. 1. Optimization of annealing temperature using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. The optimal annealing temperature for the Ultra-rapid real-time PCR was tested in the range from 55°C to 65°C, the lowest C_T of 23.28 cycles and the fastest C_T time of 10 minutes 44 seconds was measured on 57°C, annealing temperature.

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 GENECHECKER (Gene System Co., Korea)를 사용하였으며, PCR 조건은 95°C, 15초 초기 변성 후, 95°C, 1초 변성, 57°C, 2초 혼성, 72°C, 2초 중합의 조건으로 50 회전을 진행하였다.

결과 및 고찰

L. fusiformis 특이 유전자 초고속 검출을 위한 PCR 조건 최적화

L. fusiformis 특이 초고속 PCR에서 최적의 혼성 온도를 파악하고자 재조합 DNA 1.0 \times 10⁶ 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

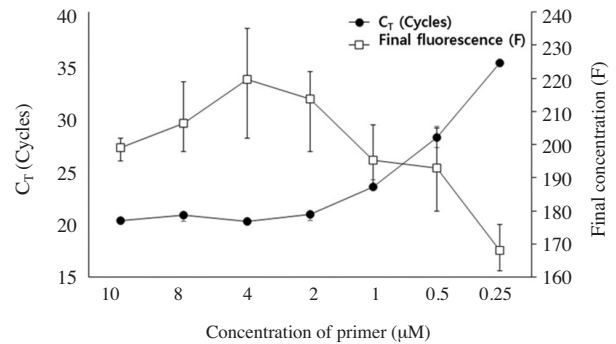


Fig. 2. Optimization of primer concentration using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. Using various concentration of primers, optimal concentration of *L. fusiformis*-specific primer were selected for Ultra-rapid PCRs. Using each 4 μ M primers, C_T was estimated the lowest cycles than others. 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, $F=223 \pm 17.67$).

회전), 최종 형광값(증폭량, $F=221$) 모두에서 우수한 결과를 보인 57°C로 결정하였다(Fig. 1).

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).

L. fusiformis 특이 유전자의 최소 검출 시간에 따른 검출 한계 초기주형량 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, 중합)의 시간을 3초에서 1초까지 조절하여 초고속 PCR을 시행하였고 변성시

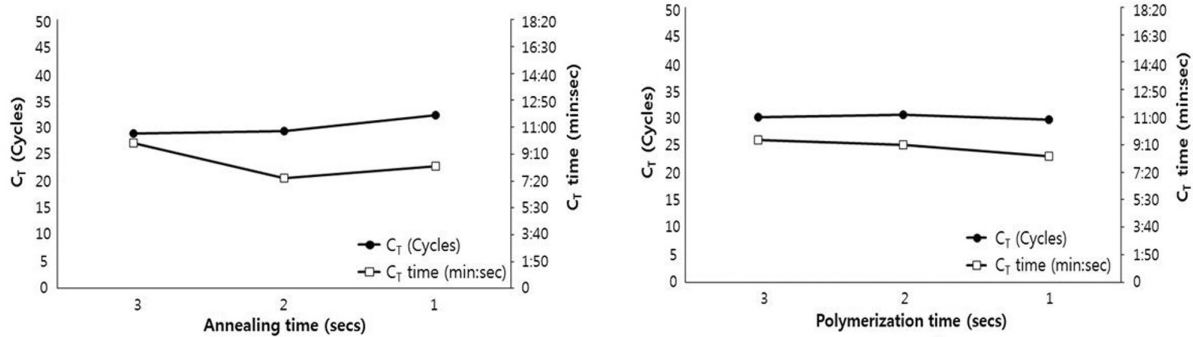


Fig. 3. Minimum time of annealing and/or polymerization in *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. The annealing time and polymerization time were shortened to set the minimum detection time in *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. Denaturation step was fixed at 1 sec in each cycle of PCR and the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

간은 1초로 고정하여 실험을 수행하였다.

1.0×10^3 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).

한편, 변성, 혼성, 중합시간을 각 1초, 2초, 1초로 단축한 결과, DNA 증폭을 나타내는 형광곡선은 초기주형량에 따라 비교적 정상적인 증가를 보여주었으나 1.0×10^3 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 1.0×10^8 분자부터 1.0×10^0 분자까지 동일한 C_T 값에서 동시에 증폭됨을 볼 수 있어 정량적 측정이 불가능하다고 판단하였

다(Fig. S1).

따라서 *L. fusiformis* 특이 초고속 PCR은 PCR 시스템의 안정성 또한 고려하여 각 회전의 변성, 혼성, 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).

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 보

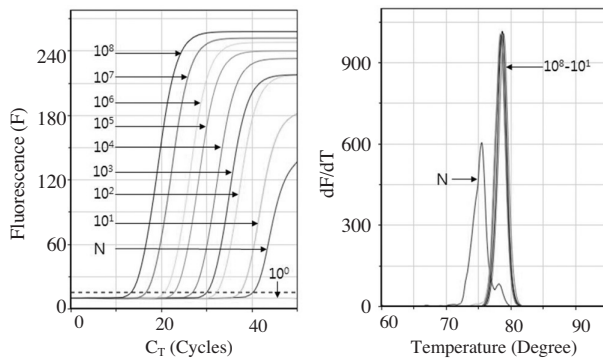


Fig. 4. Detection limit of *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid real-time PCR with serially diluted specific DNAs. The detection limit of *L. fusiformis* gene was estimated using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid real-time PCR under the minimum times of thermocycling (1 sec of denaturation step, 2 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.

여 우수한 민감도를 확인하였다. 10^1 씩 감소시킨 초기분자량 간의 C_T 값 차이를 dC_T 라 하며, 1.0×10^8 분자에서 1.0×10^1 분자까지의 평균 dC_T 값은 약 3.30회전이었고, 1.0×10^1 분자의 초기 주형에서도 평균 C_T 값은 36.74회전이었고, 평균 C_T time은 11분 11초이었고, T_m 값 또한 78.47°C 로 *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 40회전 부근에서 C_T line을 넘는 증폭이 관찰되었으나, 이 T_m 값은 *L. fusiformis* 유효범위의 T_m 과 3.99°C 수준의 차이를 보이는 74.56°C 로 측정되어 특이적 증폭이 아님을 쉽게 확인할 수 있었다.

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).

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 1ml 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 20.93회전(C_T time=6분 22초), 25ng에서 23.45회전(C_T time=7분 8초), 10ng에서 26.64회전(C_T time=8분 7초), 1ng에서 28.18회전(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).

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 1,000배 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°C 로, *L. fusiformis*의 양성 증폭의 유효범위($78.55 \pm 0.73^\circ\text{C}$) 안에 해당함으로 *L. fusiformis* 유전자의 증폭

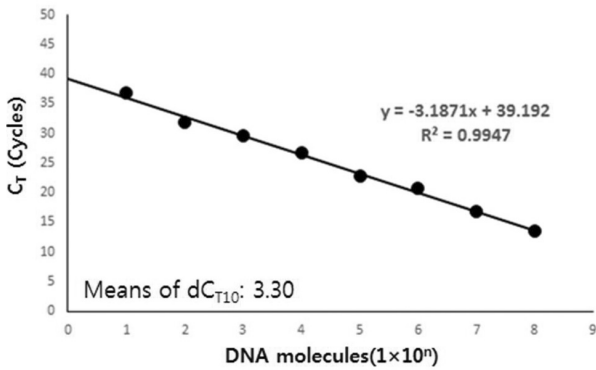


Fig. 5. Regression equation based on *L. fusiformis* specific molecules and C_T using *L. fusiformis*-specific Ultra-rapid PCR. dC_T indicates difference between C_T value (cycles) of PCRs using 10^{-1} serial diluted initial templates.

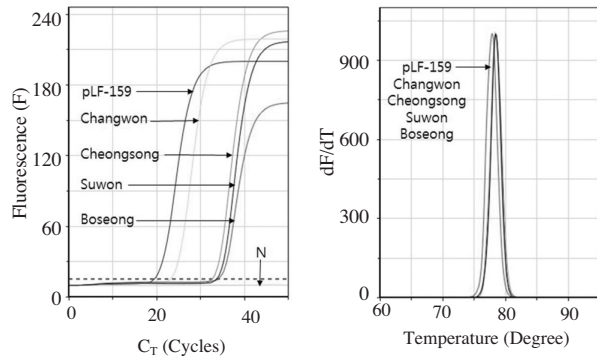


Fig. 7. *L. fusiformis*-specific UR-PCR for the detection with commercial bumblebee samples. UR-PCR was performed with 50ng gDNA from dead bumblebee as initial templates. The PCR condition was 95°C, 15 sec of pre-denaturation, 95°C, 1 sec of denaturation, 57°C, 2 sec of annealing, 72°C, 2 sec of polymerization in each cycle for 50 cycles. *L. fusiformis* specific gene were amplified with commercial bumblebee from Suwon, Boseong, Changwon and Cheongsong.

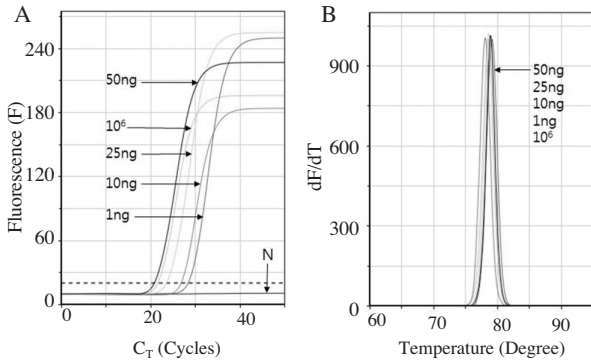


Fig. 6. The comparison between gDNA of *L. fusiformis* and target gene on pLF-159. The Ultra-rapid PCR of *L. fusiformis*-specific gene was performed using 50ng-1ng gDNA of *L. fusiformis* and 1.0×10^6 molecules of pLF-159. Panel A is the fluorescent graph of amplification according to initial gDNA.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

임을 판정할 수 있었다(Table 2).

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 7.27 μ g gDNA를 추출하였고, 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 현

재로써 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, 생산과정에서의 *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 수분 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.

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	-	+	+	+	+	+

적 요

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 22초만에 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 1개체씩 실험한 결과, *L. fusiformis*가 검출됨에 따라, 국내 최초로 뒤영벌에서 *L. fusiformis*의 존재를 확인할 수 있었다. *L. fusiformis* 특이 유전자 초고속 PCR법은 실험실에서 뿐만 아니라 현장에서 정량적 검출을 하기에 유용한 방법이 될 것이며 더 나아가 뒤영벌 수출입을 위한 검역 기준으로 사용되기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 수출전략기술개발사업(과제번호 115067-02), 첨단생산기술개발사업(과제번호 115058-02, 과제번호 115102-03), 농생명산업기술개발사업(과제번호 312027-03)과 2017학년도 경기대학교 대학원 연구원장학생 장학금 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용 문헌

- 김원태, 최지영, 김종길, 황석조, 최영철, 한상미, 김미애, 이대원, 윤희주. 2008. 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)과 호박벌(*B. ignitus*)에 대한 병원성 세균 분리. *Journal of Apiculture* 23: 13-20.
- 김정민, 임수진, Truong A Tai, 홍기정, 윤병수. 2017. 초고속 유전자 증폭법을 이용한 벌집꼬마밀빠진벌레(*Aethina tumida*)의 신속한 검출 기법 개발. *Journal of Apiculture* 32: 119-131.
- 남성희, 윤희주, 김삼은. 2003. 호박벌(*Bombus ignitus*)에서 분리된 석고병균, *Aspergillus flavus* Link의 형태학적 특성. *Journal of Apiculture* 18: 43-48.
- 민상현, 김정민, 임수진, 김병희, 이철우, 윤병수. 2017. 뒤영벌 병원체 11종에 대한 실시간 중합효소 연쇄반응 검출법 개발. *Journal of Apiculture* 32: 99-109.
- 임수진, 김정민, 이철우, 윤병수. 2017. 꿀벌 6종 주요 병원체에 대한 초고속 다중 PCR 검출법의 개발. *Journal of Apiculture* 32: 27-39.
- 최용수, 이만영, 홍인표, 김남숙, 김혜경, 변규호, 윤희주. 2010. 뒤영벌류(*Bombus terrestris*와 *Bombus ignitus*)에서 꿀벌바이러스 진단. *Journal of Apiculture* 25: 259-266.
- 최용수, 이명렬, 이만영, 김혜경, 이광길, 이경용, 윤희주. 2009. 국내 최초 서양뒤영벌(*Bombus terrestris*)에서의 Deformed Wing Virus (DWV) 진단. *Journal of Apiculture* 24: 23-30.
- 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.
- 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.
- Priest, F. G., M. Goodfellow and C. Todd. 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Microbiology* 134: 1847-1882.
- 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.
- Smith, E. C. 1993. Inoculation Experiments with *Bacillus fusiformis* isolated from Tropical Ulcer with Obse-

rvations on the Bacillus. Epidemiology and infection 33: 95-102.

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.

Supplementary Data

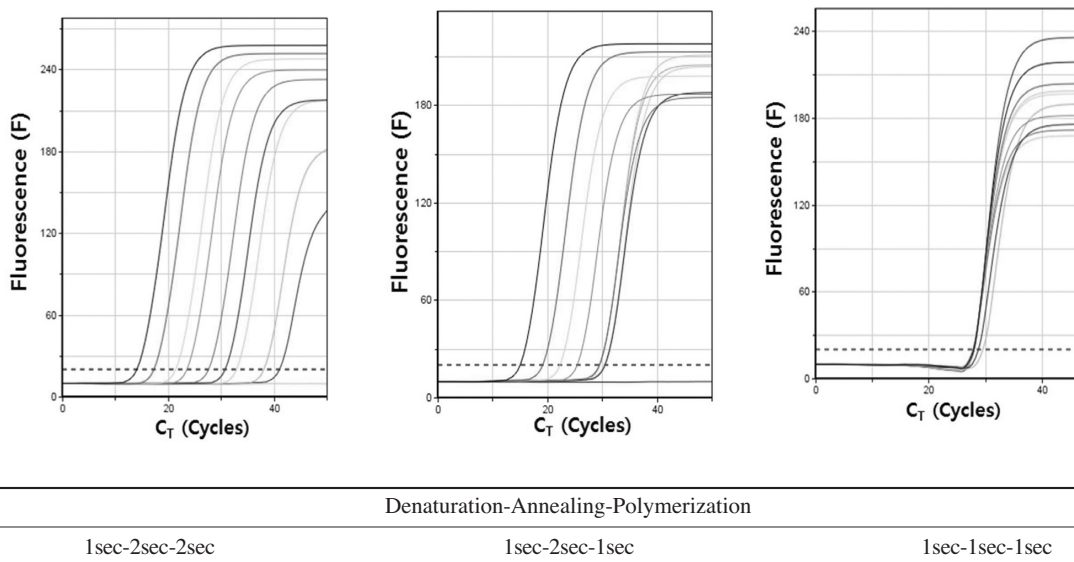


Fig. S1. Comparison among fluorescence graphs according to time reduction.

Table S1. Comparison among C_T , dC_{T10} , and C_T time of *L. fusiformis*-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 22sec	15.29	-	4min 24sec
1.0×10^7	17.47	3.1	5min 19sec	19.24	3.95	5min 32sec
1.0×10^6	21.43	3.96	6min 31sec	22.27	3.03	6min 25sec
1.0×10^5	23.46	2.03	7min 8sec	25.29	3.02	7min 17sec
1.0×10^4	27.39	3.93	8min 20sec	29.18	3.89	8min 23sec
1.0×10^3	30.40	3.01	9min 15sec	30.19	1.01	8min 41sec
1.0×10^2	32.47	2.07	9min 53sec	30.09	0.1	8min 40sec
1.0×10^1	37.44	4.97	11min 23sec	29.25	0.84	8min 25sec
1.0×10^0	-	-	-	-	-	-
Mean of dC_{T10}		3.30			2.26	