

碩士學位論文

# 꿀벌 미국부저병 진단 Kit 개발



濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科

康 元 明

2006年 6月

碩士學位論文

# 꿀벌 미국부저병 진단 Kit 개발

指導教授 林 允 圭



濟州大學校 大學院

獸 醫 學 科

康 元 明

2006年 6月

# 꿀벌 미국부저병 진단 Kit 개발

指導教授 林 允 圭

康 元 明

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2006年 6月



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

康元명의 獸醫學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	신 태 권	
委 員	손 원 순	
委 員	임 윤 규	

濟州大學校 大學院

2006年 6月

## 초 록

# 꿀벌 미국부저병 진단 Kit 개발

(지도교수 : 임 윤 규)

강 원 명

제주대학교 대학원  
수의학과

*Paenibacillus larvae*에 의한 세균성 질병인 미국부저병은 꿀벌의 유충에 감염되어 양봉산업에 막대한 영향을 주고 있다. 미국부저병 진단을 위하여, *P. larvae* 아포에 대한 마우스 단클론항체를 수립하여 ELISA 및 immunochromatographic assay (ICA)를 개발에 적용하였다. *P. larvae*에 대한 특이 단클론항체 Pla03, Pla06, Pla07 및 Pla26은 IgG1 type였으며, Pla23은 IgG2b type이었으며, 13종의 기타 세균과 교차반응을 보이지 않았다. ELISA 및 ICA에 적용한 흡착항체는 Pla07, 접합체로는 Pla06을 pair로 구성하였다. 배양된 *P. larvae*의 아포를 희석하여 검사한 ELISA법의 검출한계는  $10^5$ spore/ml이었으며, PCR의 결과와 비교한 민감도 및 특이도는 96.0% 와 100%를 보였다. ICA의 검출한계는  $10^7$ spore/ml이었으며, PCR 결과와 비교한 민감도 및 특이도는 92.0% 와 100%를 보였다. 본 연구에서 개발된 ELISA kit과 ICA kit은 꿀벌의 미국부저병 감염 진단을 위한 실험실적 및 현장검출법으로 적용이 가능할 것으로 판단되었다.

---

주요어 : 미국부저병, 꿀벌, *Paenibacillus larvae*, 단클론항체, Immunochromatographic assay, ELISA

# 목 차

I. 서	론	.....	1
II. 재료 및 방법	.....	3	
III. 결	과	.....	10
IV. 고	찰	.....	19
V. 결	론	.....	21
VI. 참 고 문 헌	.....	22	
영 문 초 록	.....	24	



## I. 서 론

미국부저병(American foulbrood, AFB)은 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*에 의한 꿀벌의 세균성 질병으로 가장 많이 발생되고 치명적인 질병이다 (양과 윤, 2001; Bailey and Ball, 1991).

이 병원체는 꿀벌만을 숙주로 하여 꿀벌의 유충에 침입하고, 내생포자에 의해 전염되며, 감염 후 잠복기간이 길고, 감염속도도 빠르며, 높은 치사율을 보여 양봉 산업에 막대한 피해를 주고 있다 (Bamrick, 1964; Atkins 등, 1970). 국내에서도 1950년대 이래 전국에서 지속적으로 발생하고 있는데, 감염된 유충은 500만 개 이상의 아포를 만들어 2차 전염원이 되며 아포가 내열성 및 내화학성이 강해 같은 장소에서 매년 연속적으로 발생하기도 한다 (양과 윤, 2001).

미국부저병은 국내 양봉산업에 가장 심각한 피해를 입히고 있어 현재 이 질병은 제2종가축전염병으로 분류, 관리되고 있다 (가축전염병예방법 제2조).

*P. larvae* subsp. *larvae*는 그람양성 간균 (2.5~5.0 $\mu$ m×0.7~0.8 $\mu$ m)으로 편모에 의한 운동성이 있고, 대부분의 세균은 4-5개 층으로 둘러싸인 아포를 형성하지만, 이 세균은 7개 층으로 둘러싸여 더욱 강력하다 (Bakhiet 과 Stahly, 1985). 이로 인해 열이나 항생제에 저항성이 강하며, 건조상태에서도 수십 년간 병원성을 보유하며, 35-50년간 생존 한다 (Bakhiet 과 Stahly, 1985).

AFB의 진단은 주로 균을 분리하여 현미경 검경과 생화학적 검사를 통해 이루어지고 있으나, 봉군 내 감염된 애벌레는 일벌에 의해 제거되는 경우가 많으며, 세균의 배양과정에서 미국 부저병의 2차 침입세균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *alvei* 등과 복합 감염되어 초기 배양에서 실패하는 경우가 많다. 또한 많은 균주가 잠시 성장 후 자가 용해되는 특성을 가지고 있고, 생화학적 특성이 매우 빈약하여 AFB의 진단이 부정확하고 신속한 진단이 어려운 실정이다 (Sneath 등, 1986).

미국부저병의 발병이후 정확한 처치와 발병이전의 봉군이 원인균인 *P. larvae*에 의해 오염되었는지 여부를 판단하기 위해서는 정확하고 신속한 진단방법은 매우 중요한 도구이다.

최근에는 면역분석을 의한 특이항체의 개발이 시도된 바 있다 (백 등, 2002). 또한, *P. larvae*에 대한 polymerase chain reaction (PCR) 검출법이 개발되었으며 (Govan 등, 1998; 양과 윤, 2001), 신속한 진단을 위해 nested PCR (Lauro 등, 2003)과 정량성이 매우 뛰어난 Real-Time PCR (이 등, 2004)이 개발되어 보다 향상된 검색 및 진단법의 개발을 위한 노력이 계속되고 있다.

한편, 대량으로 시료를 빠르게 처리해야 할 경우나 현장에서 별도의 기기 없이 신속한 진단을 위한 ELISA나 Immunochromatographic assay (ICA)의 개발이 요구되고 있다.

따라서 본 연구의 목적은 AFB 발생시 또는 발병이전에 방역을 목적으로 오염된 봉군 여부를 판정하기 위해서, *P. larvae* 및 그 아포를 쉽고 빠르게 검색할 수 있는 ELISA와 ICA를 개발하여 현장에서의 신속한 진단에 이용하는 것이다. 이를 위하여 *P. larvae*에 특이적인 마우스 단클론항체를 개발하였고, 이를 ELISA와 ICA의 소재로 사용하였으며, ELISA와 ICA를 개발하기 위한 제반 연구를 수행하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 항원 생산

#### 1) *P. larvae* 아포항원 준비

##### (1) *P. larvae* 배양 및 아포형성

*P. larvae* (ATCC 9545)를 Brain heat infusion (BHI) plate (DIFCO, U.S.A.) 에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 단일집락을 택하여 AK 배지 (Sporulating Agar) 에 도말하고 37°C에서 5일간 배양하였다. AK agar의 조성은 아래의 표와 같다 (Table 1).

Table 1. Composition of *P. larvae* culture medium per liter

	Component	amount to add per 1 liter
<i>P. larvae</i> medium	Pancreatic digest of gelatin	6.0g
	Pancreatic digest of casein	4.0g
	Yeast extract	3.0g
	Beef extract	1.5g
	Dextrose	1.0g
	Agar	15.0g
	Manganous sulfate	0.3g

##### (2) *P. larvae* 아포확인

아포형성 여부를 확인하기 위해 AK 배지에 배양된 균을 24시간 간격으로 슬라이드에 도말하여 자연 건조시킨 후, malachite green (Junsei, Japan) 염색 시약을 떨어뜨리고 알코올램프 위에서 약 5분간 끓인 후 냉각시키고 흐르는 수돗물로 세척하였다. 이후 Safranin O (Safranin, 소망제약) 로 30초간 대조염색한



후 세척하고 초록색으로 염색된 아포를 광학현미경상에서 검경하였다.

## 2) 아포항원 분리

아포형성이 확인된 plate에 배양된 아포체를 scraper로 긁어 회수하고 생리식염수에 부유시킨 후, 3회 원심분리하여 (1,600 x g, 20분) 침전물을 회수하고 소분하여 냉동보관 (-70°C)하면서 BALB/c 마우스의 면역원 혹은 hybridoma clone 선정을 위한 항원으로 사용하였다.

## 2. 단클론항체의 제조

### 1) BALB/c mouse의 면역

준비한 아포항원을 침전용적 대비 2배 용적의 생리식염수에 부유시킨 후 아포항원 50 $\mu$ l를 동량의 Complete Freund's Adjuvant (Sigma, U.S.A.)에 유제화하여 4주령의 암컷 BALB/c 마우스의 복강 내 접종하여 각 아포에 대한 면역을 실시하였다. 추가접종은 50 $\mu$ l의 항원액과 Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma, U.S.A.)을 동량으로 섞은 유제액을 5일 간격으로 3회 복강내로 접종하였으며, 5일 후에는 항원액 만을 하루 간격으로 50 $\mu$ l씩 3회 복강내로 접종하였다.

### 2) 세포융합

최종접종 24시간에 경추탈구로 희생시킨 BALB/c 마우스의 비장을 취하여 세포융합에 사용하였다. 적출한 비장은 70% ethanol에 침적한 즉시 꺼내어 washing media에 2회 침적하여 세척하였다. 세포융합에 사용되는 모든 용액은 미리 37°C로 가온하여 준비하였다.

비장세포의 분리를 위하여 50ml tube 위에 멸균된 stainless steel mesh (400목)를 거치한 후 비장을 넣고 3ml 주사기로 비장 내에 washing medium을

주입시켰다. 외피를 제거하고 washing medium 20ml를 흘려주며 분리된 비장세포가 tube내로 주입되도록 하였다. 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)로 세척한 비장세포는 세척과 동시에 미리 mid-log phase 상태로 증식시켜 준비한 SP/2 myeloma cell을 50ml tube에 넣고 동시에 원심분리 (1500rpm, 4분, 실온)하여 3회 세척하였다. 원심분리 후 침전된 세포의 packed volume이 비장세포와 동일하게 되도록 세포의 양을 조절하여 비장세포와 SP/2 myeloma cell을 혼합하였다. 이후 3회 더 원심분리(1500rpm, 4분, 실온)를 실시하여 혈청성분을 완전히 제거하였다. 마지막 세척 후 washing medium을 완전히 제거한 상태에서 침전된 세포들을 부드럽게 tapping하여 tube 바닥에 얇게 골고루 퍼지게 한 후, polyethylene glycol 1500 (Roche, GmbH)을 가하여 세포융합을 실시하였다. 융합이 완료된 세포들은 washing medium으로 3회 원심분리 (300 x g, 4분, 실온)하여 세척하였다 (정우준, 2003).

침전된 세포를 HAT medium 80ml에 부유시켜 96 well tissue culture plate (Nunc, Denmark)에 150 $\mu$ l/well 씩 분주하였다. 분주를 한 후 24시간이 경과 후, HAT medium을 5일 동안 추가하여 세포융합이 되지 않은 SP/2 cell을 사멸시키고, 융합된 hybridoma 세포만 선택적으로 배양하였다. 5일후 hybridoma 세포의 관찰이 확인되면, HT medium을 첨가시켜 주었다. 세포의 증식정도에 따라 배양액 교환주기를 조절하였다.

### 3) Hybridoma clone의 선별을 위한 ELISA

특이 항체를 분비하는 hybridoma clone을 선별하기 위하여 세포가 증식하여 well 바닥의 1/3 정도 채워졌을 때, 배양 상층액을 100 $\mu$ l씩 취하여 ELISA를 실시하였다. 항원을 coating buffer로 희석 (10 $\mu$ g prot/ml)하고, 96well ELISA plate (Nunc maxisorb, U.S.A.)에 100 $\mu$ l씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 흡착시켰다. 상층액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)로 3회 세척 후, 비특이적인 항체의 결합을 억제하기 위하여 0.2%의 bovine serum albumin (BSA) blocking 용액 200 $\mu$ l를 각 well에 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 정

치하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 3회 세척 후 건조시켜 냉장보관하면서 hybridoma 선별을 위한 ELISA에 사용하였다.

배양된 hybridoma 세포 상층액을 100 $\mu$ l씩 ELISA plate well에 가한 후 실온에서 40분 동안 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척하고 goat anti-mouse IgG-horse radish peroxydase (HRP) (Sigma-Aldrich, U.S.A.)를 conjugate buffer로 희석하여 100 $\mu$ l씩 가하고, 실온에서 40분 반응시켰다. PBS로 3회 세척하고 chromogen buffer에 0.1% ABTS (Sigma, U.S.A.)와 0.02%의 과산화수소를 함유한 액을 각 well에 100 $\mu$ l씩 첨가하고 실온에서 40분 반응시킨 후 405nm(reference 파장 492nm)에서 흡광도를 측정하였다.

ELISA 결과 흡광도가 2.0이상이 되는 clone들은 따로 선별하여 일부 동결시켜 보관하며, 제한희석법 (0.5 cell/well) 으로 특이항체를 분비하는 clone을 선별하였다. 선별된 hybridoma는 추가적인 배양을 실시한 후 복수생산에 공여하였다.

#### 4) 복수 생산



특이항체를 분비하는 hybridoma clone은 BALB/c 마우스에 2 x 10<sup>6</sup> cell 씩 접종하여 고농도의 단클론항체를 함유하는 복수를 생산하였다. 복수 생산용 마우스 (12주령, female)는 세포접종 1주일 전에 미리 pristane (Sigma, U.S.A.)을 0.5 ml씩 복강 내로 접종하여 감작시켜 놓았다. 이 후 약 10일간 복수형성 상태를 살피며 복수를 채취하였다. 채취된 복수는 원심분리 후 냉동보관 하였다.

#### 5) 단클론항체의 정제

Protein G sepharose 4B gel (Pharmacia LKB, Sweden)을 이용하여 복수 중의 IgG를 정제하였다. 복강에 접종하여 얻은 복수는 PBS로 5배 희석한 후 컬럼에 흘려 보냈으며 (0.3ml/min), 이 후 세척은 PBS로, 항체 용출은 3M NaSCN을 사용하였다. 회수된 IgG 분획은 10mM PBS, pH7.2 로 투석한 후, 단백질량을 측정하고, 제균 여과한 (0.22 $\mu$ m pore size) 다음, ELISA를 위한 흡착 plate 및 HRP 접합체의 제조에 사용하였다.

### 6) 단클론항체의 isotyping

단클론항체의 isotyping은 isotyping kit (Sigma, U.S.A.)을 이용하여 수행하였다. 제조자의 방법에 따라 hybridoma 배양 상층액 2~3ml를 적용하여 nitrocellulose membrane strip에서 biotin-avidin enzyme detection system으로 hybridoma가 분비하는 항체의 isotype을 확인하였다.

## 3. ELISA 법 개발

### 1) HRP-MAb conjugates 생산

Wilson과 Nakane (1978)의 방법에 의해 수행하였다. 우선 HRP (RZ=3.0) 5mg을 1.2ml 증류수에 녹인 후 0.1M NaIO<sub>4</sub> (Sigma, U.S.A.) 300 $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 20분간 약하게 흔들어서 주었다. 이후 단클론항체를 10mg/ml을 첨가하고 2시간 동안 실온에서 약하게 흔들어서 준 후 NaBH<sub>4</sub> (4mg/ml)(Sigma, U.S.A.)을 100 $\mu$ l를 넣어 주었다. 냉장에서 2시간 반응시킨 후 PBS를 이용하여 투석한 후 냉장에 보관하며 사용하였다. 접합체의 안정을 위하여 BSA (Sigma, U.S.A.)를 10% 되게 가하고 0.02%되게 thimerosal (Sigma, U.S.A.)을 가하여 주었다.

### 2) 단클론항체 coated plate 준비

정제된 단클론항체들을 항원으로 약 5 $\mu$ g/ml되게 흡착 buffer로 희석하고, 이를 96-well ELISA plate (Nunc polysorb, Demark)에 100 $\mu$ l씩 분주하여 37 $^{\circ}$ C의 항온기에 2시간 정치한 후 4 $^{\circ}$ C의 냉장고에 정치시켜 16시간 흡착시켰다. 여분의 면적은 0.2% BSA-PBS를 200 $\mu$ l 가하고 4 $^{\circ}$ C에 2시간 정치하여 봉쇄하였다.

### 3) Antibody pair 결정

준비된 plate를 PBS로 3회 세척하고 아포 부유액을 PBS-T에 희석하여 well 당  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 실온에서 30분간 다시 정치한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이 후 각각의 HRP-MAb 접합체를 conjugate buffer에 적절히 희석하여 각 well에  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 실온에서 30분간 방치한 후에 PBS로 3회 세척하였다. 발색액을  $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 30분 후에 이를 405nm (대조과장 492nm)에서 흡광도를 측정하여, 각 단클론항체의 조합중 발색반응이 가장 우수한 pair를 흡착용 항체 및 접합체 제조용 항체로 선정하였다.

### 4) Sandwich ELISA를 위한 capture항체와 detector항체의 조건 조사

Antibody pair로 결정된 각각의 항체 pair를 사용하여 배양된 *P. larvae*의 아포를 검출하기 위한 항원을 통하여 ELISA 최적조건을 설정하였다. 세척은 각 단계마다 PBS로 3회 실시하였다. 검사시료 및 효소접합체의 희석은 0.2% BSA가 첨가된 PBS-T에 계단 희석하여 40분간 실온에서 반응시켰다. 발색제로는 0.2%의 ABTS액을 사용하여 30분간 반응시켰다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다. 즉, 꿀벌의 사체를 날개를 제거하고 microcentrifuge tube에 넣고  $200\mu\text{l}$ 의 PBS-T를 가한 후, microcentrifuge tube용 plastic 봉으로 마쇄하고 20초간 원심분리하였다 (3,000 rpm). 원심상층액은 따로 회수하여 ELISA를 실시하였으며, PCR분석 (이 등, 2004)을 위해서도 동일한 시료를 사용하였다.

## 4. Immunochromatographic assay 법의 개발

### 1) Colloidal gold 접합체 제조

#### (1) 20nm colloidal gold (100ml)의 제조

주사용수<sup>®</sup> (중외제약) 89ml를 hot plate magnetic stirrer를 사용하여 60℃로 가열하고, 1% gold chloride (Fluka, switzerland) 1ml을 가하여 0.01%

되게 하였다. 그 후에 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 4ml에 증류수 6ml을 섞고, 가열된 gold chloride의 중앙에 즉시 가였다. 용액이 적색으로 변할 때까지 약 50분 정치하였고, 5분간 끓인 후 냉각하여 사용하였다. 사용된 모든 용액은 주사용수<sup>®</sup> (중외제약)를 사용하여 조제하였다.

### (2) 40nm colloidal gold (100ml)의 제조

만들어진 20nm gold 25ml에 물 153ml를 가한 다음 끓였다. 1% sodium citrate (Sigma, U.S.A.) 2ml을 가하여 0.01%가 되게 하였다. 1% gold chloride 2ml를 물 18ml와 섞은 후 1ml/min 정도로 점적하였다. 이후 온도를 유지하며 20분간 끓인 후 실온에 방치하여 사용하였다.

### (3) Gold 접합체 제조

Gold 접합체를 만들기 위하여 시작 조건은 전형적으로 plain gold의 OD값이 1.0이 되게 하고 단백질농도는 0.1mg/ml이 되게 하였다. plain gold의 산도는 0.1% NaOH (Sigma, U.S.A.)로 맞추다가 미세한 조정 시에는 0.01% NaOH를 사용하였다. 접합체 제조를 위하여 pH 7.5로 조정된 plain gold 10ml에 항체를 점적한 후 30분간 정치하였다. NaOH로 pH를 9까지 올린 후 BSA (10 $\mu$ l of 10%/ml gold)를 가하였다. 10분간 정치 후 이를 원심분리 (10,000 $\times$ g 30분, 4 $^{\circ}$ C, Kontron T-324, Italy)시켜 맑은 상층액을 걸어내고 gold 접합액 (1% T-20, 1% BSA, 2-3% sucrose, in 100 mM PB)에 재 부유하였다.

## 2) Immunochromatography

Nitrocellulose transfer membrane (Whatman, SP003, U.S.A.)을 5mm 폭으로 절단한 후, 정제된 항체를 10mg/ml을 2.0 $\mu$ l씩 넣고 dotting하여 실온에서 건조한 후 ICA를 실시하였다. 민감도와 특이도 검사를 위한 시료의 준비는 ELISA의 경우와 동일하게 수행하였다.

### Ⅲ. 결 과

#### 1. 항원의 정제

*P. larvae*를 BHI 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 그람염색을 한 결과 그람양성의 간균임을 확인하였다 (Figure 1, A). 24시간 배양 후, AK 배지에서 배양 한 후, 아포염색을 한 결과, 배양 시간의 경과에 따라, 푸른색의 malachite green 에 염색되는 아포가 safranin O에 의해 염색되는 붉은 색의 영양 세균에 비해 크게 증가됨을 알 수 있었다 (Figure 1, B-F).

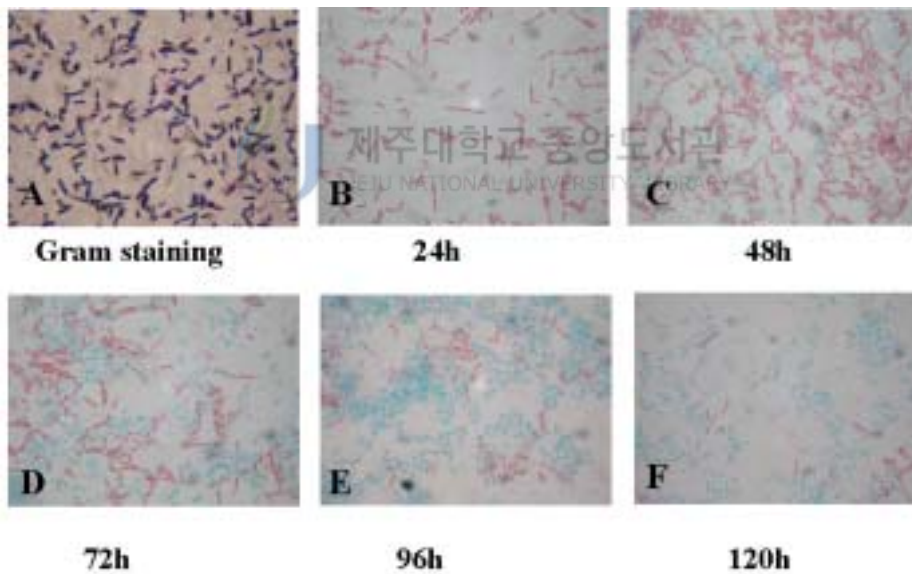


Figure 1. Gram staining (A) of *P. larvae* incubation onto Brain Heat Infusion agar at 37°C for 24 h and sore (B to F) staining of the organism at 24h, 48h, 72h, 96 h and 120 h incubation onto AK agar at 37 °C.

## 2. 단클론항체

### 1) 단클론항체 복수 역가

Cell fusion을 통하여 선출한 *P. larvae* 아포와 특이적으로 반응하는 hybridoma clone 중 지속적인 계대를 통하여 안정적인 항체분비를 확인한 결과 Pla03, Pla06, Pla07, Pla23 및 Pla26의 5종 clone을 얻었다. 이 clone들을 마우스에 접종하여 얻은 복수를 Protein G Sepharose gel (Pharmacia LKB, Sweden)을 이용한 affinity chromatography를 통하여 정제한 단클론항체들의 역가를 ELISA로 측정된 결과는 Figure 2와 Table 2에서 보는 바와 같이 과 같이 OD값이 0.1 이상으로  $10^5$  배 이상부터 역가를 나타내었다.

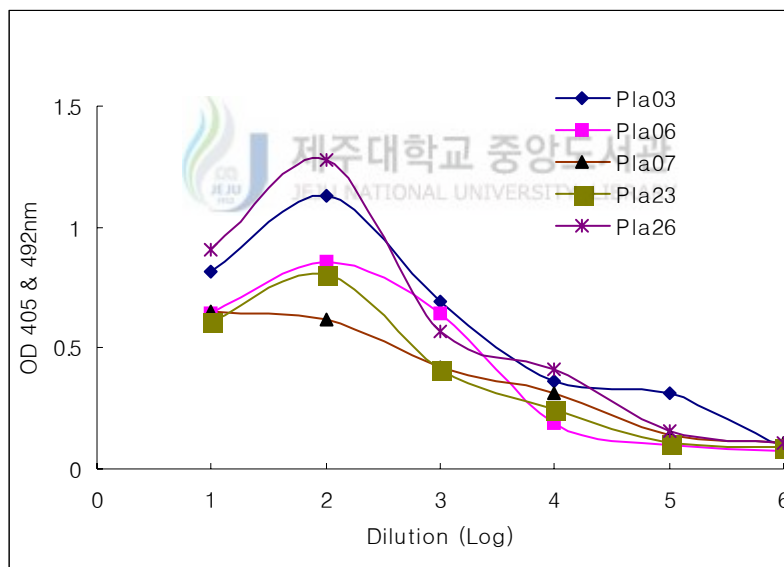


Figure 2. ELISA results of culture supernatant of hybridoma clones showing specific reaction with *P. larvae* spore antigen.



Table 2. Titer and protein concentration of affinity purified monoclonal anti-*P. larvae*

Clone	Protein Con. mg/ml	Titer
Pla03	0.66	10 <sup>6</sup>
Pla06	2.85	10 <sup>5</sup>
Pla07	3.79	10 <sup>5</sup>
Pla23	0.5	10 <sup>5</sup>
Pla26	3.2	10 <sup>5</sup>

## 2) 단클론항체의 Isotype

선택된 항체의 isotype은 Table 3와 같이 Pla03, Pla06, Pla07 및 Pla26은 IgG1으로 Pla23은 IgG2b로 결정되었다. 이들 clone은 특이도를 보이는 조합을 선별하여 아포 검출용 sandwich ELISA kit의 개발에 사용하였다.

Table 3. Immunoglobulin G isotypes of monoclonal antibodies to *P. larvae* spore

Clone no	Antibody type
Pla03	IgG1
Pla06	IgG1
Pla07	IgG1
Pla23	IgG2b
Pla26	IgG1

### 3) 단클론항체의 특이도

본 연구에서 최종적으로 선정된 5종의 단클론항체들이 다른 세균들과 교차반응을 보이는가 알아보기 위하여, Table 4에서와 같이 소장중인 일반세균 13종을 대상으로 ELISA를 실시한 결과 공시된 세균들과 교차반응을 보이지 않았다.

Table 4. Specificity analysis of antibodies by ELISA with different bacterial species.

Bacterial strains	Monoclonal antibodies				
	Pla03	Pla06	Pla07	Pla23	Pla26
<i>Melissococcus plutomius</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> K88ab	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> O157:H7	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis</i> strain 1	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus mastitis</i> strain 2	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus leutus</i>	-	-	-	-	-

## 3. ELISA

### 1) Antibody pair결정

Sandwich ELISA의 capture 및 detector의 결정을 위하여 정제된 항체를 각각 plate coating 및 효소 (HRP) 접합체를 제조한 후 *P. larvae* spore

antigen ( $10^8$  cell/ml)을 사용하여 분석하였다 (Table 5). Pla07을 capture로 사용하고 Pla06을 detector로 사용하였을 때 가장 강한 반응을 나타내었으므로, 추후의 실험에 Pla06 및 Pla07 clone을 적용하였다.

Table 5. Determination of antibodies pair of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

		Detector (HRP-MAb conjugates)				
		Pla03	Pla06	Pla07	Pla23	Pla26
Capture (plate coating Mab)	Pla03	- <sup>a</sup>	-	+	+	-
	Pla06	-	-	+++	+	++
	Pla07	+	++++	++	+++	+++
	Pla23	++	+	++	+	+
	Pla26	+	-	+	+	-

<sup>a</sup> The results of OD by sandwich ELISA. -, OD=0; +, OD≤0.5; ++, 0.5<OD≤1.0; +++, 1.0<OD≤1.5; +++++, 1.5<OD≤2.0

## 2) Sandwich ELISA의 검출한계 조사

봉체내의 *P. larvae* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$  spore/100 $\mu$ l 가 되게 희석한 다음 Pla06과 Pla07을 통하여 sandwich ELISA를 실시하였다. Figure 3과 같이  $1 \times 10^5$  spore/ml의 검출감도를 보였다.

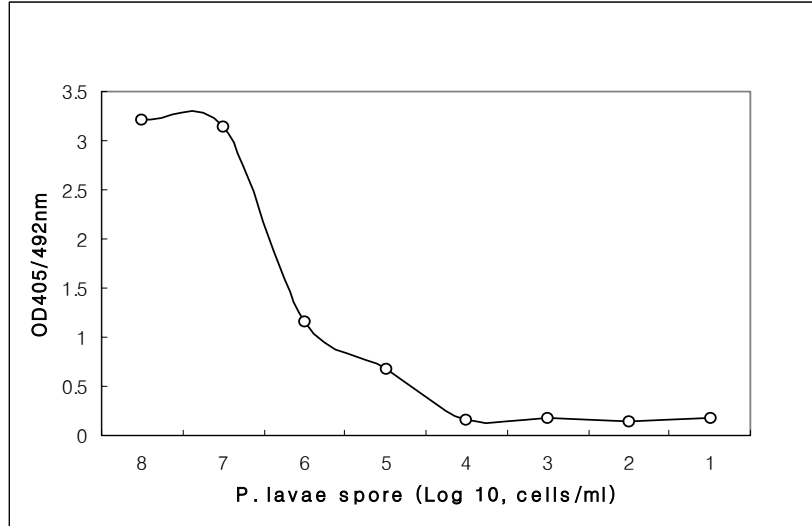


Figure 3. Limit of sandwich ELISA for the detection of *P. larvae* spore antigen.

### 3) ELISA kit의 민감도 및 특이도

미국부처의 진단에는 아직까지 표준화된 진단법이 제시되어 있지 않고, 임상진단 및 드물게 균 분리 동정 방법에 의존하기 때문에, ELISA kit의 민감도 및 특이도의 비교는 PCR 방법 (이 등, 2004)의 결과를 기준으로 비교하여 보았을 때 민감도 96.0%, 특이도 100%를 보였다 (Table 6).

Table 6. The result of comparison PCR and Rapid kit

ELISA kit	PCR (Ref. method)		Total
	Positive	Negative	
Positive	48	0	48
Negative	2	54	56
Total	50	54	

가. Sensitivity:  $48/(50) \times 100 = 96.0\%$

나. Specificity:  $54/(54+0) \times 100 = 100\%$

#### 4. Immunochromatographic assay

##### 1) Colloidal gold 제작

구경 20nm 및 40nm 로 제조된 colloidal gold를 spectrophotometer로 파장 별 흡광도를 측정한 결과 20nm 입자의 경우는 528nm의 파장에서 최대 흡광을 보였으며 (Figure 4), 40nm 입자의 경우는 536nm의 파장에서 최대 흡광을 보였다 (Figure 5). 또한 전자현미경으로 확인하였을 때 Figure 6 에서와 같이 각각 20nm 및 40nm 구경의 입자가 확인되었다.



Figure 4. Absorbance spectrum of 20nm colloidal gold.

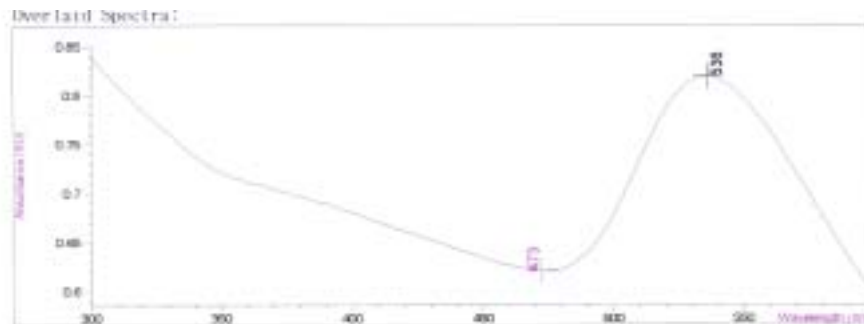


Figure 5. Absorbance spectrum of 40nm colloidal gold.

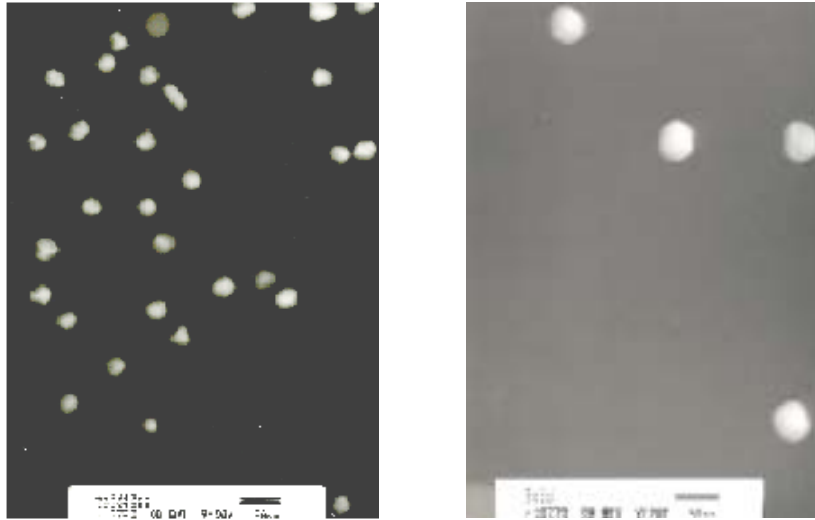


Figure 6. Transmission electron micrograph of 20nm and 40nm gold colloid.

## 2) Immunochromatographic assay법의 검출한계 조사

봉체내의 *P. larvae* spore의 검출 민감도를 조사하기 위해 spore  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^1$ /ml 가 되게 희석하여 ICA를 실시하였을 때,  $1 \times 10^6$  spore/100 $\mu$ l의 검출감도를 보였으며 이는 100 $\mu$ l의 시료량으로 고려할 때  $1 \times 10^7$ /ml 까지 검출이 가능한 성적이며, 일반적으로 ELISA 법에 비하여 낮은 검출감도를 보였다 (Table 7).

Table 7. Detection limit of immunochromatographic assay

	Spore/ml						
	$1 \times 10^2$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
Grade	-	-	-	-	±	+	++

### 3) ICA의 민감도 및 특이도

ICA의 민감도 및 특이도의 비교는 PCR에 의한 결과(이 등, 2004)를 기준으로 비교하여 보았을 때, 민감도는 92.0%, 특이도는 100%를 보였다 (Table 8).

Table 8. The result of comparison PCR and Rapid kit

Rapid kit	PCR (Ref. method)		Total
	Positive	Negative	
Positive	46	0	46
Negative	4	54	58
Total	50	54	

가. Sensitivity:  $46/(50) \times 100 = 92.0\%$

나. Specificity:  $54/(54+0) \times 100 = 100\%$

## V. 고찰

본 연구는 현재 제2종가축전염병으로 지정되어 있을 만큼 양봉농가에 많은 피해를 주고 있는 *P. larvae*에 의해 발병하는 세균성질병인 미국부저병의 신속한 조기 진단 및 현장에서 신속한 진단을 위해 필요한 ELISA와 ICA를 수행하였다.

꿀벌 질병의 정확하고 신속한 진단은 질병제어에 의해 생산성을 향상시킨다. 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae* subsp. *larvae*의 검출을 위한 PCR-kit가 개발, 생산되고 있으며 (양과 윤, 2001), 2001년 미국 부저병의 원인균인 *P. larvae*에서 비병원성 아종인 *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*가 발견됨에 따라 비병원성 균을 제외한 *P. larvae* subsp. *larvae*만을 검출해 낼 수 있는 Real-Time PCR기법이 개발되었다 (이 등 2004).

또한 미국부저병의 진단을 위한 항체 개발도 시도된 바 있으나 (백 등, 2002), 이는 polyclonal antibody로서 특이도에 문제점이 있을 것으로 사료되며, 검색키트의 제품 안정화를 위해 본 연구에서 실시한 단클론항체의 개발과 이를 이용한 ELISA kit의 개발은 특이성을 높이는 중요한 의미를 줄 수 있다고 사료된다. 본 연구에서는 단클론항체를 정제, 이용하여 ELISA 법을 개발하여 특이도를 높였으며, 이러한 단클론항체를 ICA를 이용하여 진단의 정확성을 높일 수 있게 되었다. 이러한 kit의 개발 과정에서 먼저 아포의 생산을 유도하기 위해 AK 배지에서 5일간 배양 하였을 경우 kit를 생산하기 위한 *P. larvae*의 충분한 아포 형성이 확인되었으며, 정제된 단클론항체는 *P. larvae* 와 특이적으로 반응하였다. 또한 이러한 단클론항체는 *P. larvae*를 제외한 다른 균들과 교차반응을 나타내지 않는 것으로 보아 특이도가 높은 것으로 확인되었다. *P. larvae* 진단용 ELISA의 검출한계는  $10^5$  spore/100 $\mu$ l 이었으며, 이는 100 $\mu$ l의 시료량으로 고려할 때  $1 \times 10^4$  까지 검출이 가능한 성적이며, 추가적인 최적화를 실시한다면 산업화를 위한 kit 개발이 가능할 것으로 사료된다. 이러한 검출한계를 기준으로 기존에 개발되어 있



는 PCR 기법(이 등, 2004)을 기준으로 비교하였을 경우, 민감도는 96.0%, 특이도는 100% 이었다. 또한 ICA의 개발을 위해 colloidal gold를 전자현미경으로 확인하였을 때 20nm 및 40nm 구경의 입자가 확인되었고, 제조된 colloidal gold 부유액은 현장적용 측정방법으로서 ICA의 gold-Ab 접합체로 사용이 적합한 것으로 사료된다. 이를 바탕으로 ICA의 검출한계는  $10^7$  spore/100 $\mu$ l 이었으며, 역시 PCR 기법과 비교하였을 경우, 민감도는 92.0%이고, 특이도는 100% 이었다. 이는 PCR 기법에 못지않게 민감도 및 특이도가 뛰어나며, 다수의 샘플을 위한 검사나, 특별한 기기의 필요 없이 현장에서의 신속한 진단을 위해 ELISA 기법과 Rapid kit의 개발은 쉽고 빠르게 *P. larvae* subsp. *larvae*를 진단하여 양봉농가의 경제적 손실은 최소화할 수 있을 것으로 기대된다.



## VI. 결 론

양봉산업의 생산성을 저하시키는 미국 부저병의 신속한 진단을 위하여 마우스 단클론항체를 이용한 ELISA 및 ICA법 개발연구를 수행한 바, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *P. larvae*의 아포항원은 AK agar에 5일간 배양하여 준비하였으며, 이 때 충분한 아포의 형성이 확인되었다.
2. BALB/c 마우스에 면역시켜 얻은 pla03, pla06, Pla07 및 Pla26은 IgG1 type이었으며, Pla23은 IgG2b type이었다.
3. 수립된 5종의 단클론항체들은 유럽부저병의 원인체인 *Melissococcus pluton*을 포함한 13종의 균주와 교차반응 없이 *P. larvae*와 높은 특이도를 보였다.
4. ELISA 및 ICA에 적용시킬 항체 pair는 Pla06 및 Pla07로 결정하였다.
5. ICA에 적용할 colloidal gold는 40nm 구경으로 개발하였으며, 전자현미경으로 확인하였을 때 비교적 고른 입자임을 확인하였다. 또한, 40nm 구경의 colloidal gold는 spectrophotometer로 흡광 spectrum을 조사하였을 때 536nm에서 peak를 보였다.
6. 개발된 ELISA법의 검출한계는  $10^5$ spore/ml이었으며, PCR 결과와 비교한 민감도 및 특이도는 각각 96%와 100%를 보였다.
7. 개발된 ICA법의 검출한계는  $10^7$ spore/ml이었으며, PCR 결과와 비교한 민감도 및 특이도는 각각 92%와 100%를 보였다.

결론적으로 이 연구에서 개발된 ELISA법 및 ICA법은 꿀벌의 미국부저병의 실험실적 및 현장진단법으로 응용이 가능할 것으로 사료된다.

## VII. 참고문헌

백경찬, 양옥순, 정규희, 윤병수. 2002. *Paenibacillus larvae*에 대한 다클론 항체 및 그 응용. 한국응용곤충학회지. 41(1):49-53.

법률 7434호 가축전염병예방법 제2조(정의) 제2호 나목(제2종가축전염병).

양옥순, 윤병수. 2001. Metalloprotease 및 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 미국부저병의 원인균 *Paenibacillus larvae*의 신속 PCR 검출법. 한국양봉학회지 16(1), 1-8.

이도부, 양옥순, 한상훈, 임운규, 윤병수. 2004. Real-Time PCR을 이용한 미국부저병 원인균인 *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*의 신속진단. 한국양봉학회지 19(2), 97-108.

정우준. 2003. 녃치 비텔로제닌에 대한 단일클론항체. 제주대학교 대학원 석사학위논문.

Atkins, E.L. Jr., Anderson, L.D., and Greywood, E. A., 1970. Research on the effect of pesticides on honeybees. Am. Bees. J. 110, 1968-1969.

Bailey, L. and Ball, B.V., 1991. Honey bee pathology. Academic press, London & New York.

- Bakhiet, N., and Stahly, D.P. 1985. Ultrastructure of sporulating *Bacillus larvae* in a broth medium. Appl. Environ. Microbiol., 50, 690-692.
- Bamirick, J.F., 1964, Resistance to american foulbrood in honeybees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. J. Insect Pathol. 6, 284-304.
- Govan, V. A., Allsopp, M.H., and Davison S., 1999. A PCR detection methods for rapid identification of *Paenibacillus larvae*, Appl. Environ. Microbiol., 65, 2243-2245.
- Lauro FM, Favaretto M, Covolo L, Rassa M, and Bertoloni G., 2003. Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. Int J Food Microbiol., 81(3), 195-201.
- Sneath, P.H.A., and Mair, N.S., 1986. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Vol. 2 Williams and Wilkinss. 1070-1071.
- Williams, M.R., D.A.G. Maxwell and R.L. Spooner. 1975. Quantitative studies on bovine immunoglobulins, normal plasma levels of IgG2, IgG1, IgM and IgA. Res. Vet. Sci., 18: 314-321.
- Wilson M.B. and Nakane P.K. Recent development in the periodate method of conjugating horseadish peroxidase (HRPO) to antibodies., North. holland. biomedical., 1978

## Abstract

### Development of immunoassay kits for the detection of *Paenibacillus larvae* infection in HoneyBee.

(Advised by Professor Yoon-Kyu Lim)

Won Myoung Kang

Department of Veterinary Medicine  
Graduate School, Cheju National University  
Jeju 690-756, Korea



American foulbrood is very harmful bacterial disease caused by *Paenibacillus larvae* infection in honeybee, leads great damage to bee-farming and subsequently results in critical loss of productivity in many cases. To detect the infection of *Paenibacillus larvae*, the ELISA and the Immunochromatographic assay methods were developed using specific monoclonal antibodies against *Paenibacillus larvae* spore. Four of the monoclonal antibodies produced were identified to be IgG1 and one to be IgG2b. No cross-reactivity of the antibodies were detected with the 13 kinds of bacteria including *Melissococcus pluton* which is causative agent of European Foulbrood, indicating that the monoclonal antibodies were highly specific for *Paenibacillus larvae*. The detection limits of *Paenibacillus larvae* spore were determined to be  $10^5$  spore/ml, and the sensitivity and specificity were 96% and 100% respectively in

ELISA. The detection limits of *Paenibacillus larvae* spore were determined to be  $10^7$  spore/ml, and the sensitivity and specificity were 92% and 100% respectively in immunochromatographic assay. These results suggested that the ELISA and immunochromatographic assay developed in this study could be applied in diagnosis of American foulbrood.

---

Keywords : American foulbrood, honeybee, *Paenibacillus larvae*, monoclonal antibody, ELISA, Immunochromatographic assay

