

Paenibacillus larvae*에 대한 다클론 항체 및 그 응용*Polyclonal Antibody against *Paenibacillus larvae* and its Application**

백경찬 · 양옥순 · 정규희 · 윤병수*

Kyoung-Chan Baek, Ok-Soon Yang, Kyu-Hoi Chung and Byoung-Su Yoon*

Abstract - *Paenibacillus larvae* is a gram-positive, spore-forming bacterium that is etiological agent for american foulbrood disease (AFB), which is the most severe disease in honey bee. To detect *P. larvae* from infected honeybee-comb or larvae, polyclonal antibody against whole bacterium was produced from guineapig and its specificity was evaluated. After optimization of ELISA-based detection system using these antibodies, a number of different *P. larvae* strains were analysed. Polyclonal antibody against *P. larvae* ATCC 25748 showed high affinity to most strains of *P. larvae* including *P. larvae* strain ATCC 9545 (type strain), ATCC 25747 and other korean strain, SJ15 but exhibited no cross-reaction with other bacterial species. Additionally, this type of ELISA system was used for the detection of AFB in field-application. The results have shown that this antibody could be useful for the rapid identification and monitoring of *P. larvae* in honeybee-comb.

Key words - AFB, Guineapig, Polyclonal antibody, *Paenibacillus larvae*

초 록 - *Paenibacillus larvae*는 Gram양성의 내생포자 형성 세균으로, 꿀벌의 질병 중 가장 심각한 피해를 입히는 미국부저병(AFB)의 원인균이다. 이 *P. larvae*를 발병전인 봉군 또는 애벌레에서 보다 빠르게 검출하기 위하여 기니아피그를 이용하여 이 병원균에 대한 다클론 항체를 제작하였고 또한 그 항체의 성능을 평가하였다. 제작된 항체를 이용한 ELISA 검색법을 개발한 후, 다수의 *P. larvae* 균주를 검사하였다. 그 결과 *P. larvae* ATCC 25748의 균체를 사용하여 제작된 항체는 ATCC 9545 (대표균주), ATCC 25747, 국내 분리 균주인 SJ15 등과 높은 항체 친화성을 나타내었으며, 다른 세균 종들과는 반응하지 아니하였다. 또한 이 ELISA 검색법은 미국 부저병의 현장검사에 적용하기 위하여 사용되었으며, 그 결과로 본 연구에서 제시하는 항체는 벌집 내 또는 애벌레 내에 존재하는 *P. larvae*의 빠른 동정과 모니터링에 매우 유용함을 보여주었다.

검색어 - 미국부저병, 기니아피그, 다클론항체, *Paenibacillus larvae*

미국부저병(American Foulbrood disease)은 꿀벌의 질병 중 가장 치명적인 세균성 질병으로 *Paenibacillus larvae*가 원인균이며, 꿀벌만을 숙주로 하여 꿀벌의 유충에 침입하여 치사를 유도하게 된다 (Bamrick, 1964; Davidson, 1971; Eckert, 1960). 미국 부저병은 내생포자에 의해 전염되며, 감염 후 잠복

기간이 길고, 감염속도도 빨라 양봉산업에 막대한 피해를 입혀 왔기 때문에 법정 전염병으로 관리되어 왔다 (Atkins *et al.*, 1970; Shimanuki *et al.*, 1968).

미국 부저병은 1950년대 국내에 발병되어 국내 양봉산업에 궤멸적 피해를 입힌 바 있으며, 그 후 지속적으로 발병하여 아직도 국내 양봉산업에 가장

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

경기대학교 자연과학부 생물학전공 (Dept. of Biology, Kyonggi University, San 94-6, Yui-dong, Paldal-gu, Suwon-si Kyonggi-do, 442-760, Republic of Korea)

많은 피해를 입히는 세균성 질병으로 지목되고 있고(Yoon, 2001), 양봉 생산성 저하 및 항생제의 과용, 남용의 직접적 원인이 되고 있다.

현재 미국부저병의 발병은 죽은 꿀벌 및 애벌레의 색과 냄새 등, 매우 비과학적인 방법으로 판별하고 있다. 이는 미생물학적 방법을 이용하여 검사할 수는 있으나(Alippi, 1992), 봉군 내 감염된 애벌레는 일벌에 의해 제거되는 경우가 많으며, 세균의 배양과정에서 미국 부저병의 2차 침입세균인 *P. alvei* 등에 우점되어 초기 배양에서 실패하는 경우가 많았다. 더욱이 많은 균주가 잠시 성장 후 자가 용해되는 특성을 가지고 있으며, 또한 알려진 생화학적 특성이 매우 빈약하여(Sneath *et al.*, 1986), AFB병의 진단에 있어서 부정확함과 신속성 결여의 문제를 야기시키고 있다.

최근 미국부저병의 신속진단법으로 16S rDNA와 metalloprotease유전자의 염기서열에 기초한 PCR진단법(Govan *et al.*, 1999; Yang and Yoon, 2001)이 소개되어, 정확한 신속진단법의 가능성을 보여주었으나, 대량의 시료를 빠르게 처리할 수 있는 ELISA방법이나, 현장에서 별도의 기기없이 바로 판정이 가능한 면역크로마토그래피 법(lateral flow rapid kit 등)은 아직 개발 중에 있는 것으로 사료된다.

미국부저병의 정확하고 신속한 진단방법은 발병 이후 정확한 처치를 위하여 중요할 뿐 아니라, 발병 이전의 봉군이 원인균인 *P. larvae*에 의해 오염되었는지 여부를 판단하기 위하여도 매우 중요한 도구이다. 이러한 역학 조사는 *P. larvae* 또는 그 포자의 존재여부로 판단할 수 있으며, 이는 대량의 시료를 처리할 수 있는 또는 현장판독이 가능한 면역학적 방법에 의하여야 실효를 거둘 수 있을 것이다.

따라서 본 연구는 AFB로 의심되는 병의 발생 시 또는 발병 이전에 방역의 목적으로 오염된 봉군 여부를 판정하기 위하여, *P. larvae* 및 그 포자를 쉽고 빠르게 검색할 수 있는 *P. larvae* 검색용 ELISA법을 개발하고자 하였다. 본 ELISA법은 기니아피그를 면역숙주로 제작한 *P. larvae*에 대한 특이 다항체를 사용하였으며, 이 항체로 여러 *P. larvae* 균주들의 균주 특이성을 비교하였으며, 오염된 소비로부터 *P. larvae*의 검출을 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주 중 *Paenibacillus larvae* ATCC 25748, ATCC 25747, ATCC 9545은 ATCC

(American Type Culture Collection)에서 분양 받았으며, 경북 상주 양봉장에서 분리된 균주인 SJ15 및 *P. alvei* 한국산 분리 균주 KG5, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, 기타 꿀벌 유래 세균 등을 대조균으로 사용하였다. 균주 배양은 일반적으로 BHI (Brain Heart Infusion, Difco)배지를 사용하였으며, 면역숙주로는 생후 8개월 수준의 기니아피그(약 800 g)들을 대한실험동물(주)에서 구입하여 사용하였다.

면역항원 제조 및 면역주사

BHI-milk plate (5%)에서 투명한을 형성하는 ATCC 25748 단일 균집락을 선별하여 *P. larvae* 특이 PCR 검출법(Yang and Yoon, 2001)으로 확인하였다. 기니아피그에 대한 면역은 다음과 같이 면역항원을 제조하여 실시하였다(Yoon, 1999). 즉, ATCC 25748 균주를 1 L BHI에 증균배양, 원심분리로 침전시키고, PBS에 100 mg/ml로 부유시켜 초음파 분쇄하였다(VCX-400, Sonics & Materials Inc.; Amplitude 40%, Pulse on/off 0.5초, 1분). 분쇄액을 원심분리하고 침전물을 Disruption buffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.8, 0.5% TritonX-100, 0.6 M KCl)에 10 mg/ml로 부유하여 면역항원단백질을 제조하였다. 1차 면역주사에 2.5 mg의 면역항원을 complete Freund's adjuvant (Gibco-BRL, U.S.A)와 1:1로 혼합하여 기니아피그의 등에 피하주사하였고, 2주 간격으로 5 mg의 면역항원을 incomplete Freund's adjuvant와 1:1로 혼합하여 2, 3차 면역주사하였다. 4차, 5차 및 6차 면역은 2, 3차와 같은 양을 각 1주 간격으로 주사하였다.

각 면역주사 전에 귀에서 채혈하고 혈청을 분리하여 항체가 비교에 사용하였으며, 최고의 항체가를 보인 6차 면역 완료 후 기니아피그를 마취 해부하여 심장에서 전체혈하고, 상온에서 2시간, 4°C 18시간 정치한 뒤, 원심분리(8000 rpm, 30분)로 혈청을 분리하여 *P. larvae*에 대한 항혈청을 회수하였다. 회수한 항혈청(다클론항체)은 그대로 분주하여 냉동 보관하며 실험에 사용하였다.

항 *P. larvae* 항체를 사용한 ELISA법

항체가 및 특이성 비교를 위해 제작된 다클론 항체를 1차 항체로, *P. larvae* 및 비교 균주를 항원으로, anti-guineapig-IgG 항체를 2차 항체로 하여 ELISA를 수행하였다. 본 실험법은 본 *P. larvae* 검색용 ELISA법의 최적조건으로 재 구성된 것으로 기본적인 방법은 다음과 같다. 96-well ELISA plate (Corning사)를 사용하여 각 well 당 50 µl 항원(각 균주의 18시간 배양액 또는 그 균체 파쇄액)으로 코팅(Coating buffer; carbonate-bicarbonate, pH 9.6)하

고, 정치(4°C, 18 hr 또는 37°C, 4 hr)한 뒤 반응액을 제거하고, 각 well 당 50 µl blocking solution (0.1% BSA-PBS)에 4°C, 1 hr 정치하였다. 이를 제거하고 PBS (Phosphate- buffer saline pH 7.2)로 3회 세척한 뒤, PBST (0.05% Tween20-PBS)로 희석한 1차 항체 (50 µl/well; 일반적으로 1 : 10000을 사용)를 가하고 상온에서 30분간 반응시키었다. 반응 후 PBS로 3회 세척하고, 1/10,000 (PBST)로 희석한 이차항체를 각 well 당 50 µl씩 가하고 상온에서 30분 동안 정치하였다. PBS (Phosphate-buffer saline pH 7.2)로 3회 세척 후 50 µl, 0.04% OPD 기질용액(4 mg o-phenylenediamine, 4µl H₂O₂ (30%), 10ml (Citrate-phosphate buffer pH 5.0)을 가하여 기질효소반응을 확인(15-30 분)하였고, stop solution (2.5N H₂SO₄)으로 반응을 종결시켰다. 반응한 발색정도를 ELISA reader (Bio-rad 사)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blotting (Immunoblotting)

다항체의 *P. larvae* 특이성을 Western blotting (Towbin et al., 1979)으로 비교하였다. *P. larvae* 표준 균주 및 부저 발병 양봉장에서 분리한 분리균주, 그 외 다른 균주를 대상으로 비교하였으며, 각 균주를 초음파 파쇄하여 실험에 이용하였다. 1차 항체로는 전체혈로 얻어낸 기니아피그 다항체를 사용했고, 2차 항체로는 ELISA와 마찬가지로 anti-guineapig IgG 항체를 사용하였다.

파쇄된 균체 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, 이 단백질 패턴을 PVDF membrane (Boeringer manheim 사)에 Protein Blotter (Biometra사)를 사용하여 5 mA/cm²의 전류로 50~70분 동안 처리하여 이동시킨 후, Ponceau S 용액으로 염색해서 옮겨진 band를 확인하였다. PVDF membrane을 blocking solution (3% skim milk-TBS)에 넣고 30분간 상온에서 약하게 진탕시킨 후 TBST로 5분 동안 3회 세척하였다. 3% skim milk-TBST로 희석한 1차항체를 넣고 30분간(RT) 흔들면서 반응시킨 후 TBST로 5분간 3회 세척하였다. 이차항체 반응은 3% skim milk-TBST로 1/10,000 희석시킨 anti-guineapig IgG 항체(Sigma)로 상온, 30분간 진행하였고 반응이 끝난 후 TBST로 5분간 3회 세척하였다. DAB solution을 처리하여 발색반응을 확인하였고, 물로 세척하여 반응을 종결시켰다.

오염이 의심되는 소비에서 *P. larvae* ELISA detection

부저병이 발병하기 전에 면역학적 방법으로 부저병균을 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여 부저

병이 발생했던 오염 소비와 오염되지 않은 소비의 벌집을 이용해서 균의 검출을 시도하였다. 소비의 상단 좌우부(벌꿀저장부위), 소비의 중앙부(산란부위), 하단 좌우부에서 3×3 cm 크기로 벌집을 잘라내, 이를 멸균증류수에서 분쇄한 뒤 상온에서 20분간 정치해서 고형물을 가라 앉힌 후 상등액 100 µl를 BHI에 접종, 배양(37°C, 180 rpm 진탕배양)하였다. 접종 후 1일, 3일, 5일, 11일 경과된 배양액을 ELISA 검색하여 *P. larvae* 검출여부 및 시기와 소비에서의 검출부위를 비교 확인하였다.

결과 및 고찰

면역항원의 준비

면역항원 *P. larvae* ATCC 25748을 skim milk plate에 배양하여 투명환을 확인하고 PCR 검출법(Yang, Yoon, 2001; Govan, 1999)과 현미경 검경으로 확인하였다. PCR 검출 반응을 수행했을 때 각각 405 bp와 973 bp의 *P. larvae* 특이 band를 전기영동으로 확인할 수 있었고, 배양액을 현미경으로 검경하였을 때 균사처럼 길게 붙어 자라는 *P. larvae*의 특성을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 ATCC 25748을 증균배양하여 초음파 분쇄 후 면역항원단백질로 제조하였다.

다클론 항체의 생산 및 항체가 비교

2차, 3차 면역주사 후 증가된 항체가 4차, 5차, 6차의 면역 시에 큰 변화를 보이지 않기에 면역을 중단하고 기니아피그 1두 당 약 15 ml의 혈액을 채취하여 항혈청(다클론항체)을 회수하였다. 다클론 항체를 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000으로 희석하였고 각각의 희석된 다클론 항체를 항원농도 10 µg, 1 µg, 0.1 µg, 0.01 µg에 대하여 그 항체 역가를 비교하였다(Fig. 2). 1/1,000의 다클론 항체는 10~0.1 µg의 항원농도에서 OD 2~3.0의 높은 역가를 나타내었다. 1/10,000으로 희석된 항체는 1 µg의 농도에서 OD값 1.0 이상의 항체역가를 나타내었으며, 1/100,000의 희석비에서는 전체 항원 농도에서 OD값 1.0 이하의 낮은 역가를 나타내었다. 따라서 다항체 1/10,000, 항원 농도 1 µg을 최적 농도로 정하였고, 이후 ELISA 및 western blotting에 적용하였다. 기니아피그에서 회수된 항혈청은 두 당 약 15 ml로, 이는 본 실험에 따르면 약 300,000회의 ELISA검사를 수행할 수 있는 양이다.

항 *P. larvae* 항체 특이성

항체의 *P. larvae* 균주 특이성을 조사하기 위해 *P.*

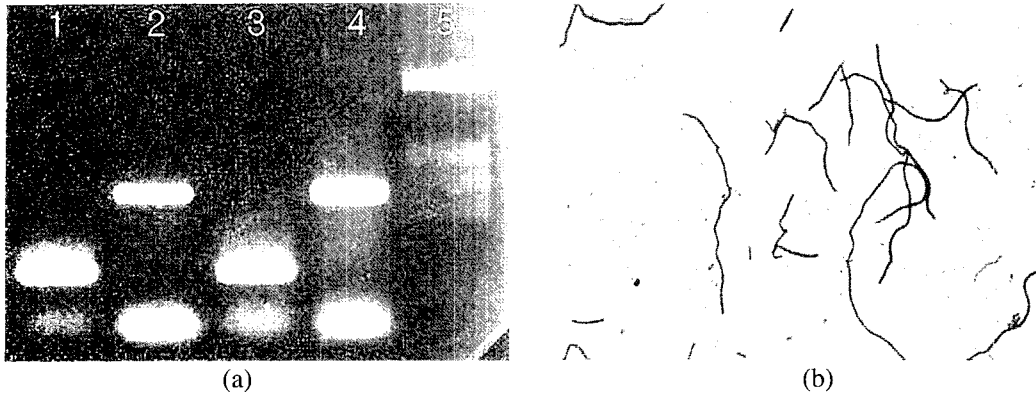


Fig. 1. PCR-detection and identification of *Paenibacillus larvae* strain ATCC 25748. (a) PCR detection of *P. larvae* strain ATCC 25748. Lane 1, PCR was performed with *P. larvae* ATCC 25748 lysate using 16SP1/16SP2 primer-pair deduced from 16 rRNA gene in *P. larvae*. Lane 2, PCR was performed with *P. larvae* ATCC 25748 lysate using PL16S-123/PL16S-224 primer-pair deduced from 16 rRNA gene in *P. larvae*. Lane 3, PCR with *P. larvae* ATCC 9545 (type strain) lysate using 16SP1/16SP2 primers. Lane 4, PCR with *P. larvae* ATCC 9545 lysate using PL16S-123/224. Lane 5, DNA size marker, 2.84 kb, 1.30 kb, 1.08 kb, 860 bp, 290 bp, respectively. (b) *P. larvae* ATCC 25748. Typically long and narrow chains of bacteria are observed (1,000×).

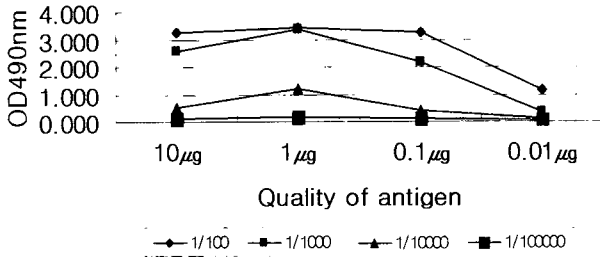


Fig. 2. Comparisons of dilution-rate of anti-*P. larvae* antibody and protein concentration of *P. larvae* lysate. Optimal dilution-rate of antibody was 1/5,000-1/10,000 for ELISA based *P. larvae* detection.

larvae ATCC 25748, *Bacillus subtilis*, 한국산 분리 단간균 KG5를 비롯한 꿀벌 유충 유래 기타 균주들을 ELISA법으로 조사하였다. 본 연구에서 생산된 항체는 단지 *P. larvae*만에 특이적 반응을 보임을 확인할 수 있었으며, 이는 각 배양액 및 균체 파쇄물에 대하여도 같은 특이성을 보였다. 한국산 분리 단간균인 KG5는 부저 증상을 보이는 애벌레에서 가장 많이 발견되는, 2차 침입세균인 *Paenibacillus alvei*의 한국산 균주이다. 본 연구에서 생산된 항체는 이 *P. alvei*에 반응하지 않음은 물론 다른 포자형성 세균인 *B. subtilis*, 그리고 기타 꿀벌 유래 세균에 대하여도 반응하지 않는 높은 항체 특이성을 나타내었다.

Western blotting을 이용한 *P. larvae* 다클론 항체 특이성 비교

Western blotting으로 다클론 항체의 *P. larvae* 특이성을 비교하였다. *P. larvae* 표준균주 ATCC 25748,

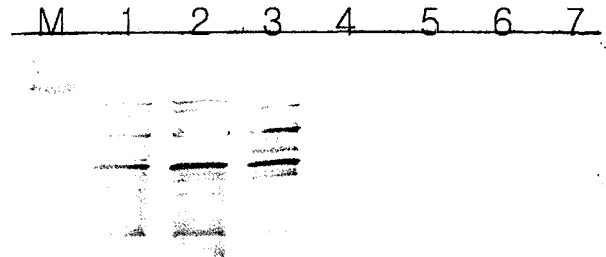
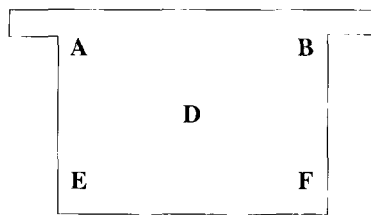


Fig. 3. Western blot analysis using anti-*P. larvae* antibody. lane M is molecular weight marker that was prestained. lane 1 is total lysate of *P. larvae* ATCC 25748; lane 2, total lysate of ATCC 25747; lane 3, *P. larvae* strain SJ15; lane 4, *P. alvei* strain KG5; lane 5, *E. coli*; lane 6, *Bacillus subtilis*; lane 7, larvae of honeybee.

ATCC 25747과 부저 발병양봉장에서 분리한 SJ15 (한국산 분리균주), *B. subtilis*, *E. coli*의 균체파쇄물 등을 SDS-PAGE를 수행하여 단백질 크기별로 분리하고 다클론 항체로 검출 부위를 확인하였다. 그 결과 *P. larvae* ATCC 25748, ATCC 25747, 한국산분리균주 SJ15 등 *P. larvae*의 균체 파쇄물에서만 뚜렷한 발색 반응을 확인하였고, 다항체와 반응하는 항원 단백질들의 크기와 반응정도가 비슷한 양상임을 확인할 수 있었다. 표준균주에서의 반응정도와 한국산 분리균주(SJ15)의 반응정도에서 약간의 발색차이가 나는 것은 한국산 균주와 표준 균주의 차이로 생각

Table 1. ELISA-test for the detection of *P. larvae* in honeybee comb

Position	after 1 day	after 3 day	after 5 day	after 11 day
CA	-	-	-	-
CB	-	-	-	-
CD	-	-	++	++
CE	-	-	-	-
CF	-	-	-	-
NA	-	-	-	-
NB	-	-	-	-
ND	-	-	-	-
NE	-	-	-	-
NF	-	-	-	-



되나, *P. larvae*가 아닌 다른 균주에서는 발색반응이 거의 없어 *P. larvae*에 대한 높은 항체 특이성을 증명하였다(Fig. 3). 이 결과는 ELISA법의 것과 동일한 결과로써, 본 연구에서 생산된 항 *P. larvae* 항체의 특이성이 ATCC 25748의 항원으로 제작한 다클론항체지만 ATCC 25747, ATCC 9545, SJ15에서도 동일한 항체 역가를 나타내는 것으로 보아 *P. larvae* 특이 공통 항원에만 반응하는 것으로 확인되었다.

벌집 내에서의 *P. larvae* 검출

*P. larvae*에 대한 다클론항체로 꿀벌 소비 내에서 *P. larvae* 잔류포자 검출이 가능한지 비교하였다. 미국부저병이 발병한 적이 없는 강군의 꿀벌소비와 미국 부저병이 발병했었던 오염된 소비에서 벌꿀 화분 저장부위(소비의 상단부 좌우)와 산란부위(소비의 중심부) 및 소비하단 좌우부위를 지정하고 벌집을 뜬어 멸균증류수에 분쇄하였고, 10분간 정치하여 고형물을 침전시킨 후 상등액을 BHI 배지에 접종 배양하였다. 벌집 부유액과 배양 1일 경과 sample, 배양 3일 경과 sample, 배양 5일 경과 sample, 배양 11일 경과 sample에 대한 ELISA 비교실험 결과, 오염소비 산란부위(애벌레가 있던 부위: D), 배양 5, 11일 경과 sample에서 *P. larvae*가 검출되었고

(Table 1) 이 결과로 오염된 애벌레가 있던 벌집부위에 *P. larvae* 포자가 잔류하는 것을 증명하였다.

이로써 미오염봉군과 오염봉군의 판정법에 본 연구 결과인 *P. larvae* 검색용 ELISA법이 매우 유용하며, 이를 근거로한 오염봉군 판정법으로 AFB 원인균을 봉군에서 쉽게 monitoring 할 수 있게 하여 발병의 예측 및 예방 또한 이로 인한 항생제 남용 및 오용을 예방할 수 있을 것으로 기대된다.

Literature Cited

- Alippi, A.M. 1992. Detection of Bacillus larvae in mixed bacterial spore populations from larval remains. Microbiologia. 8: 115~118.
- Atkins, E.L.Jr., L.D. Anderson and E.A. Greywood. 1970. Research on the effect of pesticides on honey bees 1968-69. Am. Bees. J. 110: 387.
- Bailey, L. 1981. Honey bee pathology. Annu. Rev. Entomol. 13: 191~212.
- Bamrick, J.F. 1964. Reesistance to American Foulbrood in honey bees. V. Comparative pathogenesis in resistant and susceptible larvae. J. Insect Pathol. 6: 284~304.
- Davidson, E.W. 1971. Ultrastructure of peritrophic membrane development and American Foulbrood disease pathogenesis in larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Ph. D. thesis, The Ohio State University, Columbus, Ohio.
- Govan. 1999. A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. Appl. Environ microbiol. 65: 2243~2245.
- Haseman, L. 1961. How long can spores of American foulbrood live American Bee J. 101: 298~299.
- Shimanuki, H. and T. Lehnert. 1968. Ethylene oxide for the control of American Foulbrood in honey bees. J. Econ. Ent. 61: 1456.
- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpee and J.G. Holt. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkinss. 1070~1071.
- Towbin, H., J.S. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350~4354.
- Yang, O.S. and B.S. Yoon. 2001. Rapid PCR detection of *Paenibacillus larvae* as pathogen of American Foulbrood disease by using nucleotide sequence from its metalloprotease and 16S rRNA gene. Korean J. Apiculture. 16: 1~8.
- Yoon, B.S. 1999. Manual of methods in Molecular Biology II, Kyonggi university. 417~430.
- Yoon, B.S. 2001. General Survey on the Honeybee Diseases in Korea. Korea Beekeeping Association.

(Received for publication 19 November 2001; accepted 27 February 2002)