(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월27일
(11) 등록번호 10-1588550
(24) 등록일자 2016년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A01N 59/00* (2006.01) *A01N 25/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A01N 59/00* (2013.01)
*A01N 25/18* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0008815
(22) 출원일자 2015년01월19일
심사청구일자 2015년01월19일
(56) 선행기술조사문헌
WO2012108480 A1*
2014 한국응용곤충학회 정기총회 및 춘계학술발표회 프로시딩 94면
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**김욱**
서울특별시 서초구 서초중앙로 188, C-709
**나자현**
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 80, 108동 903호
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**한양특허법인**

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 강원길

(54) 발명의 명칭 **살충 방법**

## (57) 요 약

본 발명은, 살충 대상물에 이산화염소를 처리하여 활성산소를 유발하는 것을 특징으로 하는 살충 방법에 대한 것이다.

*대 표 도* - 도1a

**Pi-SOD (GenBank accession number: KP342267)**

**[DNA] – 478 bp**

GTGTTTGTAGTCGGTCACCGTTTTTGCTGTAAAATATTAAAAGCAAGCAATT-
GCTCACAAAAACATATCAACCAGTTATTAATCAGCAGTTTGAAATCCCCCAGCGTGTAAAAT
GTCCTTAAAGGCAGTGTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACCGGCACTGTGTATTTT-
GAACAGAGGGACGCCAAATCTCCAGTAGTGCTTACTGGTGAAGTCAAGGGTCTTACTAAGGG
AAAGCATGGTTTCCATATACATGAGTTCGGAGACAACACCAACGGTTGCAC-
GTCAGCTGGCGCCCACTTCAACCCGCTGAAGAGCGACCACGGAGCGCCCGACGCCACTGTCA
GACATGTCGGCGACCTCGGCAATATTGATTGCTCCTACGATAAGGGAGTCACCAAGGTG-
TATGTGCAAGACAAACAAGATATCTCTAGTGCCCGAACACCCCAACAGCATAGTGGGTCGCA
CGCTGGTCGTGAC

**[Amino acid] – 122 residues**

MSLKAVCVLNGDVTGTVYFEQRDAKSPVVLTGEVKGLTKGKHGFHIHEFGDNT-
NGCTSAGAHFNPLKSDHGAPDATVRHVGDLGNIDCSYDKGVTKVYVQDKQISLVPEHPNSIV
GRTLVVH

(72) 발명자

**천용식**

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 114동 1404호

**김용균**

경기도 구리시 장자대로37번길 20, 201동 503호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 114063-3 |
| 부처명 | 농림축산식품부 |
| 연구관리전문기관 | 농림수산식품기술기획평가원 |
| 연구사업명 | 농생명산업기술개발사업 |
| 연구과제명 | 저곡해충 방제를 위한 이산화염소 현장 이용기술 개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 고려대학교 |
| 연구기간 | 2014.09.25 ~ 2017.09.24 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

RNAi(RNA interference)에 의해 항산화효소 유전자 발현이 억제된 화랑곡나방에 이산화염소를 처리하여, 활성산소를 유발하는 것을 특징으로 하는 살충 방법.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 화랑곡나방은 화랑곡나방의 유충, 번데기 및 성충에서 선택되는 하나 이상인 살충 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 항산화효소는 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD), 카탈라아제(catalase; CAT) 및 과산화효소(peroxidase; POX)에서 선택되는 하나 이상인, 살충 방법.

### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 항산화효소는 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD) 또는 티오레독신-과산화효소(thioredoxin-peroxidase; Trx)인, 살충 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD)는 유전자 등록번호(GenBank accession number)가 KP342267인, 살충 방법.

### 청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 티오레독신-과산화효소(thioredoxin-peroxidase; Trx)는 유전자 등록번호(GenBank accession number)가 KP342268인, 살충 방법.

### 청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 RNAi(RNA interference)는

CGAATCGCCACGCTACTAC(Pi PIAC FP);

CGACTCCACAGTCTCGGAC(Pi PIAC RP);

GGGTGATGGAGCATTTCATC(Pi HSC 70 FP);

ATCACTCCTCCAACAGTCTCG(Pi HSC 70 RP);

CTSATCATCAACACVTTYTACTC(Pi HSP 90 FP);

ACRATCTCYTTGATYTTGTG(Pi HSP 90 RP);

GTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC(Pi SOD FP);

CAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG(Pi SOD RP);

CATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC(Pi Trx FP);

CCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC(Pi Trx RP);

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAACAGCGAGTACTAGTTCTAG(Pi dsCON FP);

TAATACGACTCACTATAGGGAGATACTACACCGTATTTGGCACCG(Pi dsCON RP);

TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC(Pi dsSOD FP);

TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG(Pi dsSOD RP);

TAATACGACTCACTATAGGGAGACATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC(Pi dsTrx FP); 및

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC(Pi dsTrx RP) 중 하나 이상의 서열을 갖는 프라이머를 이용하여 제조되는 것인, 살충 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화랑곡나방 등의 해충 살충 방법에 대한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)은 저장 곡물에서 가장 큰 피해를 일으키는 관건 해충으로 남극대륙을 제외한 거의 모든 대륙에 분포하는 나방이다. 화랑곡나방에 의한 저장곡식의 피해는 특히 유충 시기에 많이 발생을 한다. 그 이유는 유충의 경우 포장지를 뚫고 들어갈 수 있고 많은 양의 실을 분비하기 때문에 저장 식품을 엉겨 붙게 하여 공정에 어려움을 끼치거나 소비자들이 피하게 하는 등의 여러 피해를 끼치기 때문이다. 또한, 천식, 피부병 등을 야기시킬 수 있는 알레르기성 물질을 수반할 수 있어 그 방제의 필요성이 대두되고 있는 시점이다.

[0003] 하지만 사람들이 직접 섭취하는 저장 곡식에 화랑곡나방 방제를 위해 농약을 사용할 수 없기 때문에 인체에 해로운 영향을 주지 않으면서 화랑곡나방을 방제할 수 있는 기술이 필요하였다. 기존 연구를 살펴보면 산화 훈증제가 곤충 방제에 영향을 준다고 알려져 있지만 그 기작에 대해선 밝혀진 바가 없으며, 활성산소를 유발함에 따라 살충 효과를 나타내는 물질에 대해서는 어떠한 연구도 없는 실정이다.

[0004] 한편, 이산화염소 (Chlorine Dioxide)는 표백제로 알려져있는 물질로, 대한민국 공개특허 제 2001-0029166호 등에는 이산화염소의 펄프 표백 방법에 대한 발명이 기재되어 있다. 그러나, 이산화염소를 이용한 화랑곡나방 살충 방법에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0005]

### 선행기술문헌

## 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제 2001-0029166호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 화랑곡나방의 유충, 번데기, 성충 등의 해충을 효과적으로 살충할 수 있는 방법의 제공을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 살충 대상물에 이산화염소를 처리하여 활성산소를 유발하는 것을 특징으로 하는 살충 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0009] 본 발명은 이산화염소를 살충 대상물에 처리하는 경우 활성산소를 유발함으로 살충대상물을 살균하는 효과가 발생함을 이용한 것으로, 살충 대상물의 항산화효소 분비를 억제함으로 이산화 염소의 살충효과를 극대화 시킬 수 있는 효과를 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는 화랑곡나방의 superoxide dismutase (SOD) 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 아미노산 서열을 나타낸 것이며, 도 1b는 화랑곡나방의 thioredoxin peroxidase (Trx) 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 화랑곡나방의 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)와 thioredoxin-peroxidase (Trx) 유전자를 동정하여 나타낸 유전자 계통분류도이다. 다른 종들의 상응 유전자들과의 높은 유사도를 나타내고 있다.

도 3a는 화랑곡나방의 스트레스 유전자의 유충, 번데기, 성충에서의 발육시기별 발현 패턴을 나타낸 것이며, 도 3b는 세균감염 후 화랑곡나방의 스트레스 유전자의 유충에서 발현량을 나타낸 것이다.

도 4a는 화랑곡나방의 유충에 이산화염소를 처리(200 ppm, 8 h)하였을 때, 스트레스 유전자 발현 패턴을 나타낸 것이며, 도 4b는 화랑곡나방의 성충에 이산화염소를 처리(200 ppm, 8 h)하였을 때, 스트레스 유전자 발현 패턴을 나타낸 것이다.

도 5a는 RNA interference (RNAi) 기술을 이용한 화랑곡나방의 항산화효소의 발현 억제 하기 위하여, 특이적 dsRNA 주입 후 SOD와 Trx의 발현억제 및 대조구로서 GFP 유전자에 대한 dsRNA 주입 후 각각의 유전자 발현 억제를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 5b는 RNAi 처리 후 세균에 대한 감염 치사율 변화를 나타낸 결과이다.

도 6a는 이산화염소의 화랑곡나방(5령충)에 대한 독성 효과로, 이산화염소 노출시간에 따른 이산화염소(200 ppm)의 화랑곡나방에 대한 사망률을 나타낸 그래프이며, 도 6b 는 이산화염소(200 ppm, 8 시간) 노출 후 경과시간별 사망률을 나타낸 그래프이다.

도 7은 RNA interference (RNAi) 기술을 이용한 화랑곡나방의 항산화효소의 발현 억제에 따른 이산화염소 처리의 살충력 변화를 나타낸 것으로, 특이적 dsRNA 주입 후 SOD와 Trx의 발현억제를 유도하고 대조구(dsCON)로서 GFP 유전자에 대한 dsRNA를 주입하였고, 이산화염소 처리는 200 ppm에 8 시간 노출을 이용한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은, 살충 대상물에 이산화염소를 처리하여 활성산소를 유발하는 것을 특징으로 하는, 살충 방법에 대한 것이다. 본 발명은 이산화염소를 살충 대상물에 처리하는 경우 활성산소를 유발함으로 살충대상물을 살균하는 효과가 발생함을 실험적으로 밝혀내어 완성된 것으로, 살충 대상물의 항산화효소 분비를 억제함으로 이산화 염소의 살충효과를 극대화 시킬 수 있는 효과를 갖는다. 즉, 이산화 염소의 처리로 인해서 활성산소가 증가하여

곤충에게 산화적 스트레스를 유발하게 되며, 이때, 곤충의 혈구세포가 이를 포획하며 세균과 함께 세포치사를 유발하게 된다.

[0013]

[0014] 상기 살충 대상물은 곤충 또는 이의 유충 및 성충 등일 수 있으며, 바람직하게는 나비목의 유충 및 성충에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 더욱 바람직하게는 명나방과의 유충 및 성충에서 선택되는 하나 이상일 수 있고, 가장 바람직하게는 화랑곡나방의 유충 및 성충에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0016] 상기 살충 대상물은 항산화효소를 분비가 억제된 것일 수 있다. 곤충 등의 살충 대상물은 활성산소를 적절하게 제거할 수 있는 항산화효소를 지니고 있으며, 이를 자체적으로 생성하거나 외부인자에 의해 발생되어 지나치게 많아진 활성산소의 활동을 억제할 수 있는데, 이러한 살충 대상물의 항산화효소의 분비를 억제하여 본 발명에 따른 이산화 염소의 살충효과를 극대화 시킬 수 있다.

[0018] 상기 항산화효소는 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD), 카탈라아제(catalase; CAT) 및 과산화효소(peroxidase; POX)에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD) 또는 티오레독신-과산화효소(thioredoxin-peroxidase; Trx)일 수 있다.

[0020] 구체적으로, 살충 대상물이 화랑곡나방일 경우, 상기 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD)의 유전자는 도 1a는 뉴클레오타이드 서열과 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으며, 상기 티오레독신-과산화효소(thioredoxin-peroxidase; Trx)의 유전자는 도 1b 의 뉴클레오타이드 서열과 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0022] 또한, 살충 대상물이 화랑곡나방일 경우, 상기 과산화물 제거효소(superoxide dismutase; SOD)의 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number)가 KP342267인 것일 수 있으며, 상기 티오레독신-과산화효소(thioredoxin-peroxidase; Trx)의 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number)가 KP342268인 것일 수 있다.

[0024] 바람직하게는, 상기 살충 대상물은 항산화효소 유전자의 발현이 억제된 것일 수 있다. 이러한 살충 대상물의 항산화효소 유전자의 발현 억제는 RNAi(RNA interference)에 의한 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 항산화효소 유전자의 발현은 항산화효소 유전자에 특이적 double stranded RNA를 처리하여 억제될 수 있다. 바람직하게는 상기 억제는 RNAi(RNA interference)은 하기 프라이머를 이용하여 제조될 수 있다:

[0025] CGAATCGCCACGCTACTAC(Pi PIAC FP);

[0026] CGACTCCACAGTCTCGGAC(Pi PIAC RP);

[0027] GGGTGATGGAGCATTTCATC(Pi HSC 70 FP);

[0028] ATCACTCCTCCAACAGTCTCG(Pi HSC 70 RP);

[0029] CTSATCATCAACACVTTYTACTC(Pi HSP 90 FP);

[0030] ACRATCTCYTTGATYTTGTG(Pi HSP 90 RP);

[0031] GTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC(Pi SOD FP);

[0032] CAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG(Pi SOD RP);

[0033] CATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC(Pi Trx FP);

[0034] CCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC(Pi Trx RP);

[0035] TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAACAGCGAGTACTAGTTCTAG(Pi dsCON FP);

[0036] TAATACGACTCACTATAGGGAGATACTACACCGTATTTGGCACCG(Pi dsCON RP);

[0037] TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC(Pi dsSOD FP);

[0038] TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG(Pi dsSOD RP);

[0039] TAATACGACTCACTATAGGGAGACATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC(Pi dsTrx FP); 및

[0040] TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC(Pi dsTrx RP) 중 하나 이상의 서열을 갖는 프라이머.

[0042] 이하에서, 본 발명을 실시예에 기초하여 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 하기에 개시되는 본 발명의 실시 형태는 본 발명의 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위는 이들의 실시 형태에 한정되지 않는다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 표시되었고, 더욱이 특허청구범위 기록과 균등한 의미 및 범위 내에서의 모든 변경을 포함한다.

[0044] **<참조예>**

[0045] 1. 화랑곡나방 사육

[0047] 화랑곡나방 유충은 인공사료(쌀겨 800 g, yeast extract 200 g, glycerol 500 ml, methyl *p*-hydroxybonzonate 2 g, sorbic acid 2 g)로 28℃, 상대습도 65-75%, 16:8 h (L:D)의 광조건에서 사육하였다. 교미와 산란은 인공사료가 포함된 직경 9 cm 페트리디쉬에서 암수 약 10 쌍으로 실시하였다.

[0049] 2. 세균 배양 및 처리

[0051] 시험에 사용된 그람음성 세균은 *Escherichia coli* Top 10으로 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 세균 처리는 각 화랑곡나방 5령 유충 한 마리 당 $4.5X10^4$ 의 세균을 미세주사기(World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 주입한 후 6, 12, 24, 48 시간 후에 유전자 발현 분석에 이용하였다. 대조구로서 세균을 희석시키는 데 사용한 100 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)을 주입하였다.

[0053] 3. SOD와 Trx 유전자 동정

[0055] 화랑곡나방의 항산화효소 유전자를 동정하기 위해서 누에(*Bombyx mori*)의 superoxide dimutase (SOD, NP001037084), Thioredoxin peroxidase (Trx, AHK05704) 유전자를 탐색 query로 이용하였다. 이 두 유전자를 NCBI의 EST (expressed sequence tag) 데이터 베이스에 접속하여 화랑곡나방 발현체에서 상동유전자들을 획득하였다. 각각의 유전자들은 이미 알려진 다른 곤충의 유전자들과 phylogenetic tree (Mega 6.0)를 이용하여 유사도를 분석하였다.

[0057] 4. 이산화염소 처리

[0059] 이산화염소는 전기분해 방식으로 제조하였다. 물에 녹여놓았다가 가스 형태로 훈증 시키는 것이기 때문에 농도 조절이 가능하였고 이를 아크릴판으로 특수 제작한 밀폐된 챔버에 가스 발생장치(푸르고팜, 화성시, 대한민국)을 이용하여 투여했다. 화랑곡나방 유충은 9 cm 페트리디쉬에 현미와 함께 투여되었다. 이 용기의 윗면은 망사로 씌어 훈증제 처리가 가능하게 하였다. 이 곤충 용기를 이산화염소 처리 챔버에 넣고 처리 기간 동안 가스누출검지기(Gas leak detector C16, Analytical technology, Collegeville, PA, USA)로 이산화염소 농도를 지속적으로 모니터링해서 처리 농도를 확인했다. 일정 시간 처리 후 화랑곡나방은 상온 실내환경으로 옮겨져 72시간 후 사망률을 조사하였다. 각 처리는 30 마리로 3 반복으로 실시하였다.

[0061] 5. RNA 추출 및 cDNA 제조

[0063] 각각의 처리된 화랑곡나방 유충의 RNA 추출을 위하여 Trizol reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA)를 이용하였다. First strand cDNA는 oligo dT primer가 들어간 RT-premix (Intron Biotechnology, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 합성하였다.

[0065] 6. RT-PCR

[0067] 총 5개의 화랑곡나방 유전자를 RT-PCR 방법으로 처리에 따른 발현 여부를 분석하였다. 각 처리 후 처리 개체의 RNA 추출 및 cDNA 제조는 상기의 방법을 따랐다. PCR 조건은 94℃에서 1 분간 변성시킨 후, 각 유전자 특이적 재생 온도에서 30 초, 그리고 Taq 중합효소의 사슬 연장을 72℃에 1 분간하여 40 회 주기로 반응시켰다. 이 실험에 사용된 화랑곡나방의 항산화효소와 스트레스단백질 프라이머는 표 1에 나타냈다.

*표 1*

[0068]

| 프라이머 이름 | 서열 |
|---|---|
| Pi PIAC FP | CGAATCGCCACGCTACTAC |
| Pi PIAC RP | CGACTCCACAGTCTCGGAC |
| Pi HSC 70 FP | GGGTGATGGAGCATTTCATC |
| Pi HSC 70 RP | ATCACTCCTCCAACAGTCTCG |
| Pi HSP 90 FP | CTSATCATCAACACVTTYTACTC |

| | |
|---|---|
| Pi HSP 90 RP | ACRATCTCYTTGATYTTGTG |
| Pi SOD FP | GTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC |
| Pi SOD RP | CAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG |
| Pi Trx FP | CATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC |
| Pi Trx RP | CCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC |
| Pi dsCON FP | TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAACAGCGAGTACTAGTTCTAG |
| Pi dsCON RP | TAATACGACTCACTATAGGGAGATACTACACCGTATTTGGCACCG |
| Pi dsSOD FP | TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACC |
| Pi dsSOD RP | TAATACGACTCACTATAGGGAGACAGCGTGCGACCCACTATGCTGTTG |
| Pi dsTrx FP | TAATACGACTCACTATAGGGAGACATTTGGAAGTGGTAATGTATTTCC |
| Pi dsTrx RP | TAATACGACTCACTATAGGGAGACCTCTTAATGTATGTCCTAGGTCTTC |

[0070] 7. RNA interference (RNAi)

[0072] SOD와 Trx 유전자의 발현을 억제하기 위해 RNAi 기술을 이용하였으며 이는 dsRNA를 이용한 것으로 표 1에 있는 특이적 프라이머를 이용하였다. RNAi는 Megascript RNAi kit (Ambion, TX, USA)의 방법에 따라 시행하였다. dsRNA의 크기는 약 200 bp이었으며 sense와 antisense 가닥을 T7 RNA polymerase에 의해 합성하였다. 유전자 발현을 억제하기 위해 dsRNA 시료에 Metafectene PRO reagent (Biontex, Plannegg, Germany)에 섞은 후 37℃에서 1 시간 동안 반응시킨 후 사용하였다. dsRNA는 각 유충 당 250 ng을 처리하였으며 처리 방법은 세균 처리에서 언급된 방법과 같다. 상기의 dsRNA가 처리된 화랑곡나방은 24 시간 후 200 ppm의 이산화염소에 8 시간 처리한 후 72 시간 후 살충율을 분석하였다. 각 처리는 10 마리씩 3 반복으로 실시하였다. dsRNA의 대조구로서 GFP (green fluorescent protein) 유전자를 이용하였다.

[0074] 8. 통계 분석

[0076] 살충률 결과는 백분율 자료로 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 분석 및 비교하였다. 또한 DUNCAN 방법으로 처리간 비교를 실시하였다.

[0078] **<실시예>**

[0080] **실시예 1: 화랑곡나방의 SOD와 Trx 유전자 동정**

[0082] 화랑곡나방의 발현 유전체를 NCBI 검색엔진으로 찾고자 기존에 알려진 SOD와 Trx 유전자를 누에나방에서 획득하였다. 이를 이용하여 화랑곡나방의 SOD와 Trx 유전자를 각각 동정하였다. SOD의 뉴클레오타이드 서열과 아미노산의 서열은 도 1a에 나타낸 바와 같으며, Trx의 뉴클레오타이드 서열과 아미노산의 서열은 도 1b에 나타낸 바와 같다. 각각의 유전자들은 다른 종들의 상응 유전자들과 높은 유사도를 나타냈다(도 2).

[0084] **<비교 실험예 및 실험예>**

[0086] **비교 실험예 1: 세균의 침입으로 인한 유전자 발현 변화 평가**

[0088] 세균 감염은 곤충 체내의 면역반응의 일환으로 감염 곤충이 활성산소를 유발한다. 이러한 산화적 스트레스에 대한 화랑곡나방의 스트레스 유전자 발현을 분석했다(도 3). 세균을 처리하지 않은 유충('L'), 번데기('P'), 성충('A')에서 스트레스 유전자들의 발현량을 확인하였을 때 열충격단백질인 PIAC25는 유충과 번데기에서 발현량이 약하게 나타났으며 HSC70은 전체적으로 발현이 되지만 특히 번데기와 성충에서 발현량이 높았다. HSP90은 유충과 번데기에서 발현량이 높았다. 항산화효소 유전자인 SOD는 전 발육시기에서 발현되었으며 Trx 역시 전과정에서 발현되었지만 특히, 유충과 성충에서 발현하는 것을 확인하였다(도 3a). 또한 세균처리 후 유충에서 발현량을 확인하였을 때 PIAC25는 발현량이 변하지 않고 일정하였으며 열충격단백질인 HSC70과 HSP90는 24 시간부터 발현량이 늘어나는 것을 확인되었다. 항산화효소인 SOD와 Trx 같은 경우도 세균 처리 후 발현이 현격하게 유도되는 것을 확인하였다(도 3b).

[0090] **실험예 1: 이산화염소 처리로 인한 유전자 발현 변화 평가**

[0092] 이산화염소를 화랑곡나방의 유충(도 4a)과 성충(도 4b)에 0, 2, 6, 12, 24 시간 동안 처리하였을 때 열충격단백질은 발현량이 줄어들었고 항산화효소 유전자의 발현량이 늘어나는 것이 확인되었다. 특히, 항산화효소 발현량 같은 경우는 세균 처리 때와 비교하였을 때 훨씬 빠른 시간대에 발현량이 급격히 증가되는 것을 확인하였다(도 4).

[0094] **실험예 2: 유전자 발현 억제 후 살충력 평가**

[0096] SOD와 Trx의 유전자 발현 억제를 각각의 dsRNA 주입을 통해 실시하였다(도 5). 각각의 유전자 발현이 억제되는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였다 (도 5a). 대조구로서 세균 단독 처리, dsRNA 단독 처리, 또는 이들의 합동처리는 화랑곡나방에 뚜렷한 치사 효과를 주지 않았다. 그러나 SOD와 Trx 유전자 발현을 억제시킨 후 세균 처리하였을 때 현격하게 높은 치사율을 보였다(도 5b).

[0098] **실험예 3: 이산화염소의 화랑곡나방에 대한 독성 효과 평가**

[0100] 일정 농도의 이산화염소를 처리한 결과 노출 시간에 따라 화랑곡나방의 사망률이 증가하였다(도 6a). 이산화염소 200 ppm을 화랑곡나방 유충에 각각 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 시간 동안 노출시킨 후 72 시간 경과후 살충율을 확인해 본 결과 반수치사시간이 8 시간으로 확인되었다. 또한 이산화염소 처리 후 경과 시간별로 사망률을 분석하여 보면, 12 시간 이후 사망 개체가 나타나서 72 시간 경과 후 최대 사망률을 나타냈다(도 6b).

[0102] **실험예 4: 항산화효소 발현억제와 이산화염소 살충력 증가 평가**

[0104] 특이적 dsRNA를 주입하여 화랑곡나방의 SOD와 Trx 유전자 발현을 각각 억제시켰다. 이러한 조건 속에 이산화염소를 200 ppm으로 8 시간 처리한 후 대조구와 살충력을 비교한 결과 이들 효소의 발현 억제가 이산화염소의 살충력을 현격하게 증가시켰다(도 7).

[0106] 상기 실험결과를 통해, 이산화 염소($ClO_2$) 처리로 인해서 곤충에게 활성산소가 유발되며, 산화적 스트레스를 유발하게 함을 확인할 수 있다. 이산화 염소($ClO_2$) 처리에 의한 산화적 스트레스에 의해, 곤충의 혈구세포가 이를 포획하며 세균과 함께 세포치사를 유발하게 된다.

[0107] 즉, 이산화염소와 산화적스트레스 사이에 살충작용이라는 기능적 관계를, RNA interference 기술을 이용하여 항산화효소의 발현 억제를 유도하고 살충 효과의 변화를 분석함으로 확인할 수 있었다.

## 도면

### 도면1a

**Pi-SOD (GenBank accession number: KP342267)**

**[DNA] – 478 bp**

GTGTTTGTAGTCGGTCACCGTTTTTGCTGTAAAATATTAAAAGCAAGCAATT-
GCTCACAAAAACATATCAACCAGTTATTAATCAGCAGTTTGAAATCCCCCAGCGTGTAAAAT
GTCCTTAAAGGCAGTGTGTGTTCTCAACGGGGATGTTACCGGCACTGTGTATTTT-
GAACAGAGGGACGCCAAATCTCCAGTAGTGCTTACTGGTGAAGTCAAGGGTCTTACTAAGGG
AAAGCATGGTTTCCATATACATGAGTTCGGAGACAACACCAACGGTTGCAC-
GTCAGCTGGCGCCCACTTCAACCCGCTGAAGAGCGACCACGGAGCGCCCGACGCCACTGTCA
GACATGTCGGCGACCTCGGCAATATTGATTGCTCCTACGATAAGGGAGTCACCAAGGTG-
TATGTGCAAGACAAACAAGATATCTCTAGTGCCCGAACACCCCAACAGCATAGTGGGTCGCA
CGCTGGTCGTGAC

**[Amino acid] – 122 residues**

MSLKAVCVLNGDVTGTVYFEQRDAKSPVVLTGEVKGLTKGKHGFHIHEFGDNT-
NGCTSAGAHFNPLKSDHGAPDATVRHVGDLGNIDCSYDKGVTKVYVQDKQISLVPEHPNSIV
GRTLVVH

도면1b

**Pi-Trx (GenBank accession number: KP342268)**

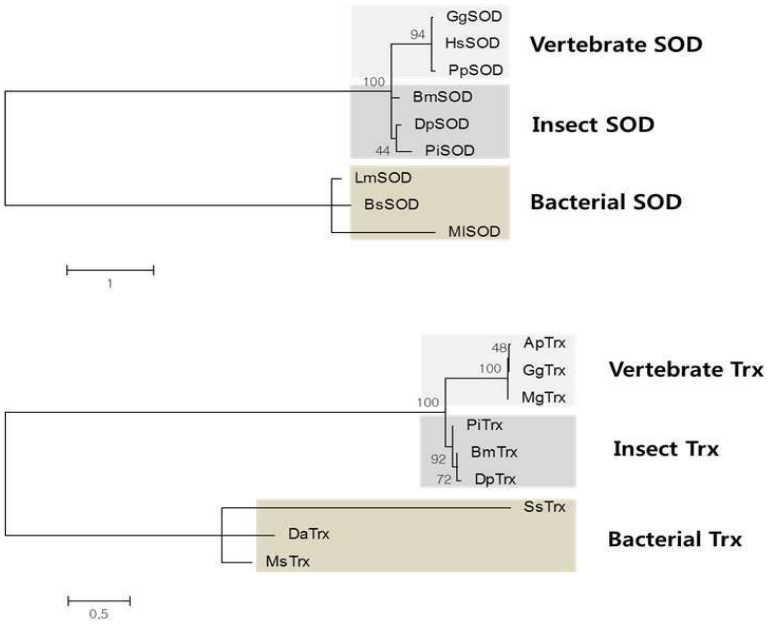
**[DNA] - 603 bp**

AGATACACGCGTCCGCCAGATACACGCGTCCGATTTTGTGACTTATTTTAATCACTCGTT-
GA-
TAAGTTTGAAAATATGGAGTTCATATTTAGATCCATTATAATGTTACTCTGTTTAAGTAGAT
ATTGTCATTCATCTTATTTTGAAAGTGACTCTTGTTATTCATTTGGAAGTGG-
TAATGTATTTCCTGGTGGTGCTCGAAAAGTTGATCATAAGTTACAATTTACAAAAGCTGTAA
TATCAAAACCGGCACCAGAATGGGAGGCTACCGCTGTTATCAATGGAGAATTTACTCAAC-
TATCTTTGTCCAGTTTTAAGGGGAAATATTTGGTTTTCTTCTTCTATCCTTTAGATTTCACA
TTTGTATGCCCTACGGAAATATTAGCATTTTCGGAAAGAATAGAAGAGTTTAAGAAAA-
TAAA-
TACAGAGGTAGTGGCTTGCTCAGTAGACTCACATTTCACTCATTTGGCATGGATCAACACTC
CTCGCAAGGAAGGTGGACTGGGAAAAATTAACATTCCTCTCTTAAGTGAT-
TTATCACATTCAATAGCANAGGATTATGGTGTATACTTAGAAGACCTAGGACATACATTAAG
AGGACTA

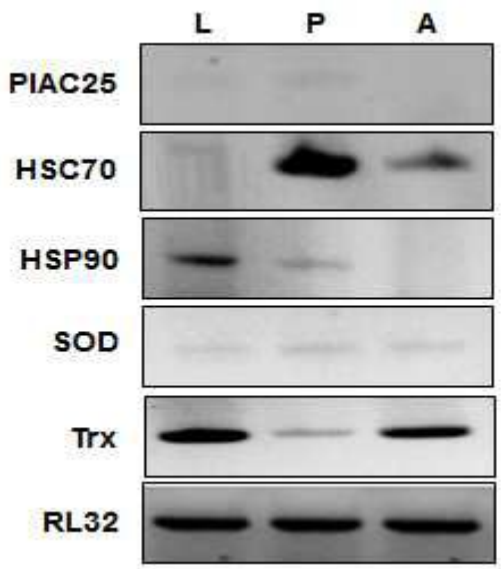
**[Amino acid] – 176 residues**

MEFIFRSIIMLLCLSRYCHSSYFESDSCYSFGSGNVFPGGARKVDHKLQFTKAVISKPAPE-
WEATAVINGEFTQLSLSSFKGKYLVFFFYPLDFTFVCPTEILAFSERIEEFKKINTEVVACS
VDSHFTHLAWINTPRKEGGLGKINIPLLSDLSHSIAXDYGVYLEDLGHTLRGL

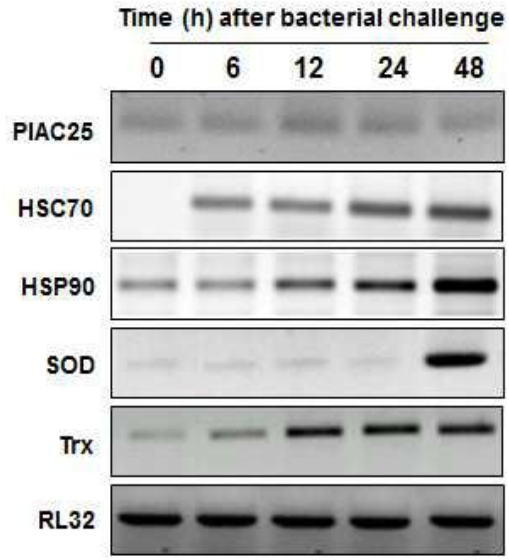
도면2



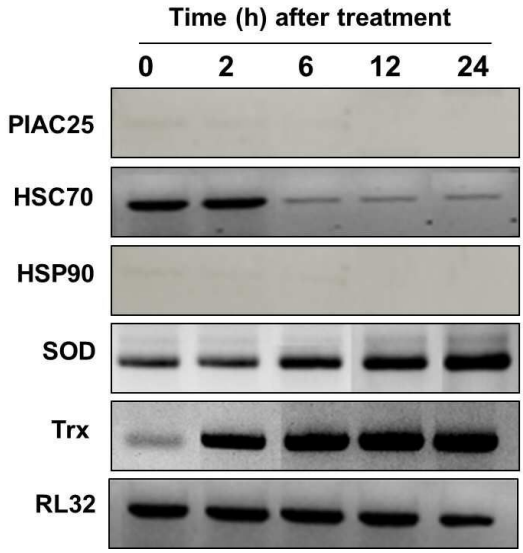
도면3a


L
P
A
PIAC25
HSC70
HSP90
SOD
Trx
RL32

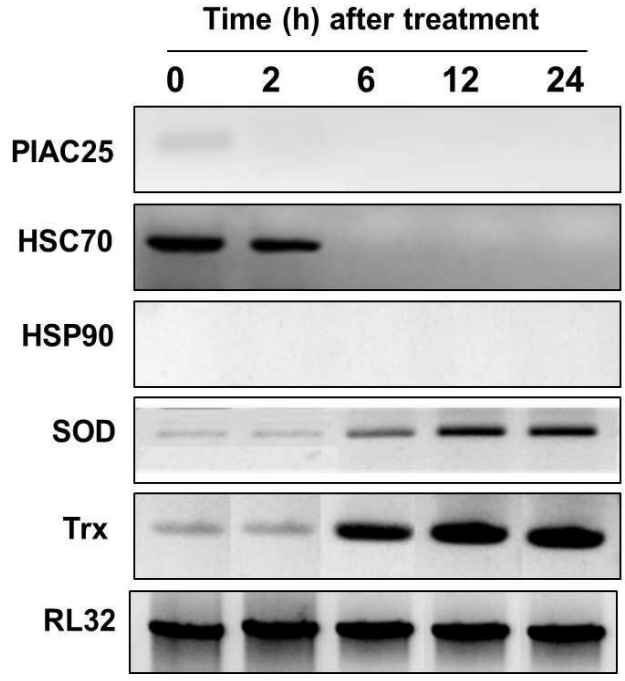
도면3b


Time (h) after bacterial challenge
0
6
12
24
48
PIAC25
HSC70
HSP90
SOD
Trx
RL32

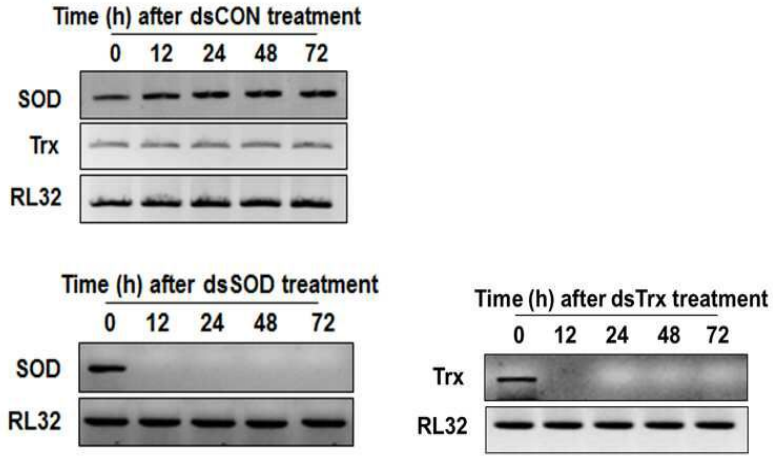
도면4a


Time (h) after treatment
0
2
6
12
24
PIAC25
HSC70
HSP90
SOD
Trx
RL32

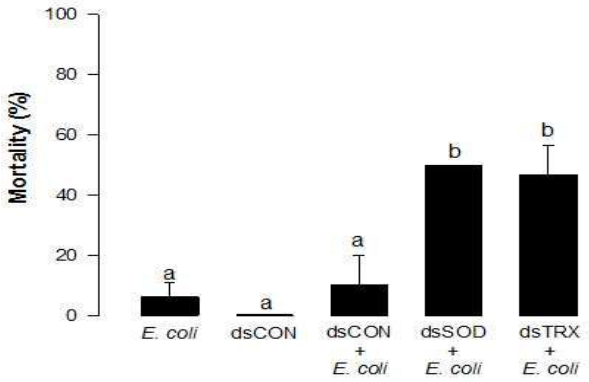
도면4b


Time (h) after treatment
0
2
6
12
24
PIAC25
HSC70
HSP90
SOD
Trx
RL32

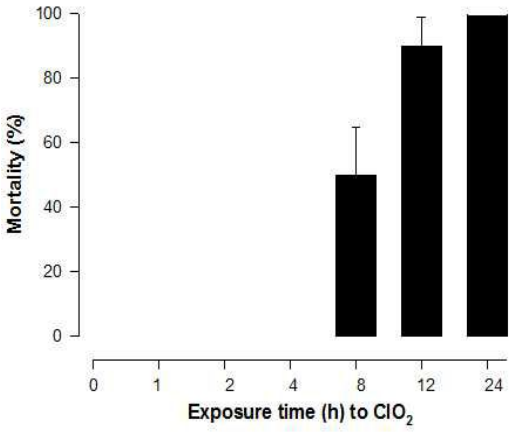
도면5a



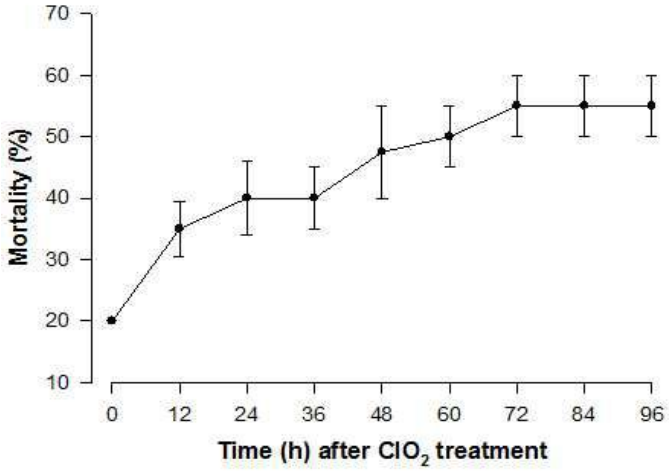

도면5b



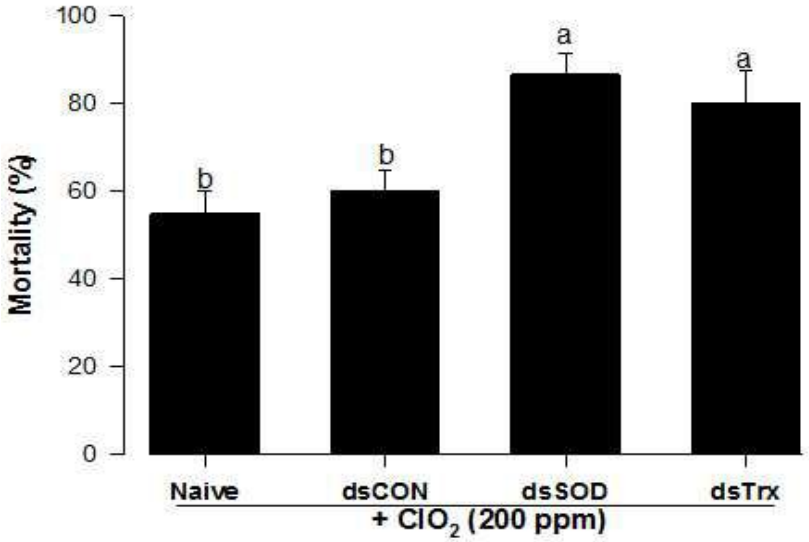

도면6a



도면6b


70
60
50
40
30
20
10
Mortality (%)
0
12
24
36
48
60
72
84
96
Time (h) after ClO2 treatment

도면7


100
80
60
40
20
0
Mortality (%)
b
b
a
a
Naive
dsCON
dsSOD
dsTrx
+ ClO2 (200 ppm)