(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0074742
(43) 공개일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 37/46 (2006.01) *A01K 47/00* (2006.01)
A01P 7/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 37/46 (2013.01)
A01K 47/00 (2022.02)
(21) 출원번호 10-2023-0160165
(22) 출원일자 2023년11월20일
심사청구일자 2023년11월20일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
성건묵
대전광역시 서구 청사로 5, 108동 504호 (월평동, 하나로아파트)
(74) 대리인
최규환

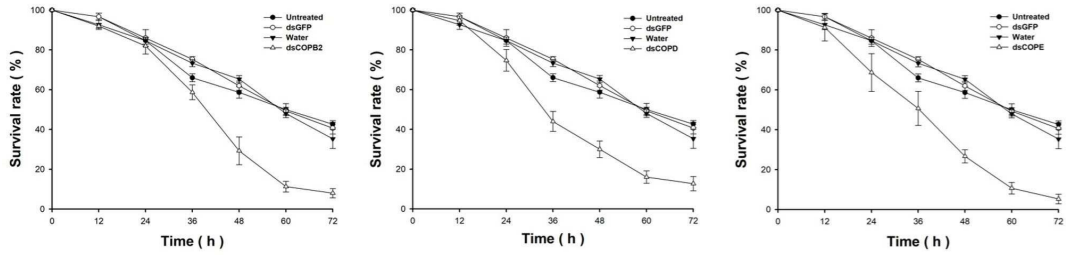
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **dsRNA를 유효성분으로 포함하는 꿀벌응애 방제용 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 dsRNA를 유효성분으로 포함하는 꿀벌응애 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 꿀벌응애(*Varroa destructor*)의 *COPB2* (Coatomer protein subunit beta2), *COPD* (Coatomer protein subunit delta) 또는 *COPE* (Coatomer protein subunit epsilon) 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 포함하는 꿀벌응애 방제용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 꿀벌응애의 방제 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A01P 7/02 (2021.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395077492
과제번호 PJ015763
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 농업정책지원기술개발사업
연구과제명 꿀벌 유전체 기반 병해충 방제 기법 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

꿀벌응애(*Varroa destructor*)의 *COPB2* (Coatomer protein subunit beta2), *COPD* (Coatomer protein subunit delta) 또는 *COPE* (Coatomer protein subunit epsilon) 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 포함하는, 꿀벌응애 방제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 꿀벌응애 방제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 dsRNA는 네이키드(naked) 형태 또는 dsRNA의 안정성 또는 표적 세포 내로의 흡수를 증진시킬 수 있는 물질로 변형된 형태인 것을 특징으로 하는, 꿀벌응애 방제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 직접 분사가능한 용액, 분말, 현탁액, 분산액, 에멀젼, 페이스트, 분진, 흩뿌림 물질 또는 과립제 형태인 것을 특징으로 하는, 꿀벌응애 방제용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 꿀벌응애(*Varroa destructor*) 방제용 조성물을 벌통에 처리하는 단계를 포함하는 꿀벌응애의 방제 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 꿀벌응애 방제용 조성물의 처리는 꿀벌에 섭식시키는 것을 특징으로 하는 꿀벌응애의 방제 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 dsRNA (double strand RNA)를 유효성분으로 포함하는 꿀벌응애(*Varroa destructor*) 방제용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 꿀벌응애(*Varroa destructor*)는 전세계적으로 문제가 되고 있는 꿀벌군집붕괴현상(Collony Collapse Disorder)의 주요 원인으로, 양봉산업에 막대한 피해를 일으키는 꿀벌 기생성 해충이다. 꿀벌응애는 원래 동남아 지역에서 동양종 꿀벌의 외부 기생충이었으나, 인간의 활동에 의한 봉군의 이동으로 인해 서양종 꿀벌 지역으로 옮겨졌고, 전 세계로 분포, 확산되었다. 꿀벌응애류는 외부 기생성을 가지고 있어 꿀벌의 유충, 번데기 및 성충에 기생하여 체액을 빨아먹는다. 상기와 같은 외부 기생은 꿀벌의 정상적인 발육을 어렵게 하여 활동성을 저하시킬 뿐만 아니라 꿀벌응애류의 발생이 심할 경우 봉군의 세력이 크게 약화되어 폐군에 이르게 되므로 양봉산업은 심각한 피해를 입게 된다.

[0003] 현재 꿀벌응애의 방제를 위해 플루발리네이트(fluvalinate), 플루메트린(flumethrin), 아미트라즈(amitraz) 또는 쿠마포스(coumaphos) 등의 약제를 이용한 방제가 주로 이용되고 있으며, 처리방법으로는 훈연, 분무, 급이, 접촉 등이 있다. 그동안 국내에서는 벌의 생육 및 양봉농가에 큰 피해를 끼치는 꿀벌응애에 대한 방제를 위해 주로 유기합성 살충제들을 이용하여 필요 이상의 방제를 하여왔고, 이 때문에 국내 서식 꿀벌응애들이 기존의

약제에 대한 강한 내성 및 저항성을 보이는 문제점도 발생하고 있다.

[0004] RNA 간섭(RNA interference; RNAi) 기술은 이중가닥 RNA(double strand RNA; dsRNA)가 세포내로 유입되어 일어나는 유전자 침묵(gene silencing) 현상이다. dsRNA가 세포 내로 전달되면 dsRNA를 20개 내외의 뉴클레오티드로 절단하는 기능을 하는 다이서(Dicer) 효소에 의해 dsRNA가 인지되면서 반응은 개시된다. 절단된 dsRNA는 siRNA (short interfering RNA)라 불리며 다양한 종류의 핵산분해 효소와 함께 RISC (RNA-induced silencing complex)를 형성하게 된다. 그 후 RISC 내로 로딩된 siRNA의 안티센스 가닥(가이드 가닥)에 의해, 상보적인 서열을 가진 목적 mRNA의 서열 부위가 절단되고 그로인해 mRNA의 빠른 분해가 일어나게 되어 목적 mRNA에 의해 코딩된 단백질의 생성이 억제된다. RNA 간섭은 유전자 특이적이며 강력한 영향력을 가지기 때문에 특정한 유전자를 표적으로 한 dsRNA를 합성하여 원하는 유전자의 발현을 억제할 수 있다는 이점으로 농업해충방제, 암세포의 발현억제, 형질전환식물 등 다양한 분야에서 활용되고 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제2439303호에는 데리스 추출물, 전나무 잎 추출물 및 캐모마일 추출물을 유효성분으로 포함하는 '꿀벌응애류 방제용 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1564842호에는 'RNAi 기반 점박이응애 방제용 dsRNA, 이를 포함하는 살비제 조성물, 이를 이용한 독성 증대 방법 및 방제 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 'dsRNA를 유효성분으로 포함하는 꿀벌응애 방제용 조성물 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 화학합성약제를 사용하지 않고 꿀벌응애를 방제할 수 있는 방법을 제공하고자 하였다.

[0007] 이를 위해 본 발명자는 꿀벌에는 영향을 미치지 않으면서, 꿀벌응애를 치사시킬 수 있는 후보 유전자들을 선정하였고, 이들 유전자에 대한 dsRNA를 제작하여 분석한 결과, 꿀벌응애의 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자에 대한 dsRNA가 꿀벌에는 영향을 미치지 않으면서 꿀벌응애에 대한 치사 효과가 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 꿀벌응애(*Varroa destructor*)의 *COPB2* (Coatomer protein subunit beta2), *COPD* (Coatomer protein subunit delta) 또는 *COPE* (Coatomer protein subunit epsilon) 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 포함하는, 꿀벌응애 방제용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 벌통에 처리하는 단계를 포함하는 꿀벌응애의 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 꿀벌응애 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA는 비표적 곤충에 대한 안정성과, 표적 해충인 꿀벌응애 특이적 치사 효과를 입증하였으므로, 향후 유전자 조작을 통한 꿀벌응애 방제법 개발에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 꿀벌응애(*Varroa destructor*) 유전체 ortholog 탐색을 통한 후보 표적유전자 선정에 관한 것으로, 표적유전자에 대한 dsRNA를 함유하는 용액에 꿀벌응애를 12시간 침지시킨 후 각 표적유전자의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 2는 도 1을 통해 선발된 *VdCOPB2*, *VdCOPD* 또는 *VdCOPE* 유전자에 대한 dsRNA를 꿀벌응애에 주입한 뒤 각 유전자의 발현 수준을 확인한 결과이다. dsGFP: 대조구 dsRNA.

도 3은 *VdCOPB2*, *VdCOPD* 또는 *VdCOPE* 유전자에 대한 dsRNA를 꿀벌응애에 주입한 뒤 꿀벌응애의 생존율을 확인한 결과이다.

도 4는 *VdCOPB2*, *VdCOPD* 또는 *VdCOPE* 유전자에 대한 dsRNA를 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)에 섭식시킨 뒤 꿀벌 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 5는 *VdCOPB2*, *VdCOPD* 또는 *VdCOPE* 유전자에 대한 dsRNA를 양봉꿀벌(*Apis mellifera*)에 섭식시킨 뒤 꿀벌의

생존율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 꿀벌응애(*Varroa destructor*)의 *COPB2* (Coatomer protein subunit beta2), *COPD* (Coatomer protein subunit delta) 또는 *COPE* (Coatomer protein subunit epsilon) 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 포함하는, 꿀벌응애 방제용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 따른 꿀벌응애 방제용 조성물에 있어서, 상기 꿀벌응애 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA는 각각 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 상기 서열번호 1 내지 서열번호 3의 염기서열은 dsRNA에서 센스(sense) 가닥의 염기서열을 의미하는 것으로, 꿀벌응애 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자에 결합하는 안티센스(antisense) 가닥은 상기 서열번호 1 내지 3의 염기서열과 상보적인 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명에 따른 방제용 조성물에 있어서, 상기 dsRNA는 네이키드(naked) 형태 또는 dsRNA의 안정성 또는 표적 세포 내로의 흡수를 증진시킬 수 있는 물질로 변형된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 dsRNA 안정성을 증진시킬 수 있는 물질의 예로는 키토산이 있다. 상기 네이키드 dsRNA 또는 변형된 dsRNA의 제조 방법은 당업계에 공지된 방법에 따라 합성 및 제조될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명에 따른 방제용 조성물은 직접 분사가능한 용액, 분말, 현탁액, 분산액, 에멀젼, 페이스트, 분진, 흩뿌림 물질 또는 과립제 형태로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명의 꿀벌응애 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 헥사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술파이트 폐액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0017] 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리케이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 본 발명의 꿀벌응애 방제용 조성물을 벌통에 처리하는 단계를 포함하는 꿀벌응애의 방제 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따른 방제 방법에 있어서, 상기 꿀벌응애 방제용 조성물은 꿀벌응애 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현을 억제하는 dsRNA를 유효성분으로 포함하는 것으로, 꿀벌응애 *COPB2*, *COPD* 또는 *COPE* 유전자의 발현을 억제하여 꿀벌응애의 치사(lethal)를 유도할 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 방제 방법에 있어서, 상기 꿀벌응애 방제용 조성물의 처리는 이로 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 꿀벌에 섭식시키는 것일 수 있다.

[0022] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] **재료 및 방법**

[0025] **1. 꿀벌응애 준비**

[0026] 꿀벌응애는 가루설탕법을 적용하여 봉군(brood)에 붙어있는 꿀벌로부터 채집되었다. 젖은 붓을 사용해 설탕을 제거한 후 페트리 디쉬에 날개가 잘린 일벌을 제공한 상태로 상온에 보관하며 실험에 바로 사용하였다.

[0028] **2. RNA 추출 및 cDNA 합성**

[0029] RNA는 TRIzol®을 사용하여 꿀벌응애로부터 추출되었다. 추출된 RNA의 농도와 품질은 NanoPhotometer N60 (Implen, Germany)을 사용하여 측정하였다. cDNA 합성은 cDNA synthesis kit (TaKaRa, Japan)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. cDNA는 사용 전까지 -20℃에서 보관하였다.

[0031] **3. 후보 유전자 선정 및 서열 유사성 비교**

[0032] 근연종인 점박이응애(*Tetranychus urticae*)에서 생존에 관여하는 유전자를 대상으로 꿀벌응애 유전체 데이터베이스에서 NCBI BLAST를 통해 후보 유전자를 탐색하였고 총 12개의 후보 유전자를 선정하였다. 또한 꿀벌응애 방제를 위해 표적 dsRNA를 사용하려면 비표적 곤충인 꿀벌(*A. mellifera*)에 영향을 미치지 않아야 하기 때문에 꿀벌응애와 꿀벌 간의 후보 유전자들의 서열 유사성을 비교하였다. 두 종간의 서열 비교는 Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)를 사용하였으며, 꿀벌응애와 꿀벌의 서열 간 유사성이 낮은 부분을 선택하여 dsRNA 합성을 위한 프라이머를 제작하였다. 후보 유전자에 대한 프라이머는 SnapDragon (http://www.flyrnai.org/cgi-bin/RNAi_find_primers.pl)에 의해 제작되었다.

표 1

[0033] 꿀벌응애 대사 및 생리작용에 주요 기능을 하는 후보 유전자 및 꿀벌과의 유사성 검정

Gene	Description	Gene ID*	Function	Homology with *A. mellifera*
COPB2	Coatomer protein complex, subunit β2	XP_022653578	Protein transport	60.78 %
COPD	Coatomer subunit δ	XP_022648612		25.44 %
COPC	Coatomer subunit ε	XP_022655169		48.31 %
SEC22B	Vesicle transport protein SEC22b-B	XP_022647036	Protein transport	56.81 %
ERV14	Vesicle transport protein ERV14	XP_022667125		54.07 %
CHMP2A	Charged multivesicular body protein 2a	XP_022646337	Transmembrane protein sorting	-
ATP6V0D2	V-type proton ATPase catalytic subunit d2	XP_022668516	Proton gradient regulation	79.37 %
ATP6V1H	V-type proton ATPase catalytic subunit H	XP_022668331		43.82 %
ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	XP_022669235		62.28 %
AQP10	Aquaporin 10-like	XP_022644794	Osmoregluration	-
AQP3	Aquaporin 3-like	XP_022647733		-
AQP11	Aquaporin 11-like	XP_022667194		24.00 %
Gene ID : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/				

표 2

[0034] 꿀벌응애 유전자 특히 프라이머 정보

Target gene		Sequence (5'-3')	서열번호
COPB2	forward	taatacgactcactatagggagaTCGTTGGAAAATGGAAGGAC	4
	reverse	taatacgactcactatagggagaAGAACGATTGACACCCCTTG	5

COPD	forward	taatacgactcactatagggagaCGCGGCAGTTTCAGTTTAAT	6
	reverse	taatacgactcactatagggagaAGGTTGTTTCGTTTCTGCGT	7
COPE	forward	taatacgactcactatagggagaGATACTCGGGTCCTGACGAA	8
	reverse	taatacgactcactatagggagaCTCATATTTACCCTGGGCGA	9
SEC22B	forward	taatacgactcactatagggagaCCACTGTCTGCCTCAGTTCA	10
	reverse	taatacgactcactatagggagaTTCCGAGCTGAGCAAGATTT	11
ERV14	forward	taatacgactcactatagggagaGTCTCTTCGACACAGGAGCA	12
	reverse	taatacgactcactatagggagaTGTGAATCTCCGTTGGATCA	13
CHMP2A	forward	taatacgactcactatagggagaAAAGCTTCAGCCAAGGAACA	14
	reverse	taatacgactcactatagggagaGCGTCTTTGCAAGTTGTTGA	15
ATP6VOD2	forward	taatacgactcactatagggagaGCTTTAAATCGGGCATCCTT	16
	reverse	taatacgactcactatagggagaCAGTCCTGAAAGAACGGAGC	17
ATP6VOA1	forward	taatacgactcactatagggagaCTCGATCCAATTTGGCAGTT	18
	reverse	taatacgactcactatagggagaGGACCGTATTGGTGCTCTGT	19
ATP6V1H	forward	taatacgactcactatagggagaTGATCAGGTGTTGCAGGTGT	20
	reverse	taatacgactcactatagggagaATGTTCGCAATAAACCCGTC	21
AQP10	forward	taatacgactcactatagggagaTGGCTATGGAGCTGGAGACT	22
	reverse	taatacgactcactatagggagaCTGCTTAGGCTTCTCATCGG	23
AQP3	forward	taatacgactcactatagggagaCGAAGATCGAACAGAAAGCC	24
	reverse	taatacgactcactatagggagaAACTCCTATGGGCACGTTTG	25
AQP11	forward	taatacgactcactatagggagaGGACCGTTGAATGTAGCGAT	26
	reverse	taatacgactcactatagggagaCACGGAGCCCACAAATAGAT	27

[0036] **실시예 1. dsRNA 준비 및 표적 유전자 선정**

[0037] dsRNA는 MEGAscript T7 High yield Transcription kit (ThermoFisher, USA)를 사용하여 T7 프로모터 서열(5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3', 서열번호 28)을 갖는 프라이머를 이용하여 얻어진 PCR 산물로부터 합성되었다. 그리고 dsRNA를 RNase-free water로 용해시킨 뒤 NanoPhotometer를 사용하여 정량하였다. 합성된 dsRNA는 -80℃에 보관하였다.

[0038] 0.9% 염화나트륨 용액에 합성된 dsRNA를 1 ㎍ 농도가 되도록 섞은 후, 꿀벌응애를 12시간 침지시키고, 꿀벌응애로부터 RNA를 추출하여 각 후보 유전자의 발현량 변화를 확인하였다. 그 결과, *AQP3, AQP11, ATP6V1H, COPB2, COPD* 및 *COPE* 유전자에 대한 dsRNA 처리군에서 표적 유전자의 발현 수준 감소와 더불어 꿀벌응애의 생존율이 감소되는 것이 확인되었다(도 1). 그 중 가장 높은 발현률 감소를 보이는 3개의 유전자 *COPB2*, *COPD*, *COPE*를 선정하여 꿀벌응애에 직접 dsRNA를 처리할 수 있는 미세주입법을 이용하여 발현률 변화를 재검정하였다.

[0039] 꿀벌응애에 dsRNA 미세주입을 수행하기 위해 꿀벌응애의 복부가 위쪽으로 향하도록 양면테이프가 부착된 유리 슬라이드에 접착하였다. 그리고 dsRNA가 체내로 주입될 동안 꿀벌응애가 움직이거나 밀리는 것을 방지하기 위해 머리 부분에 유리 슬라이드를 접착하였다. 표적 유전자와 대조 유전자 *GFP*의 dsRNA (15 ㎕, 2 ㎍/㎕)를 anal region과 postcoxal plate 사이를 통해 주입하였다. 미세주입은 Nanoject Ⅲ (Drummond, USA)를 사용하여 광학현미경 Olympus SZ51 (Olympus, Japan) 하에서 수행되었다. dsRNA가 주입된 꿀벌응애는 페트리 디쉬에 옮긴 후 3-4마리의 꿀벌 유충 또는 번데기를 먹이로 제공하고 27℃ (75% 상대습도)에서 보관하였다.

[0041] **실시예 2. 꿀벌응애 유전자 발현 분석 및 생존율 평가**

[0042] 24 또는 48 시간 후에 dsRNA가 주입된 꿀벌응애로부터 총 RNA를 추출하고 cDNA를 합성해서 qRT-PCR를 통해 표적 유전자의 상대적 발현 수준을 정량화하였다. qRT-PCR은 SYBR Green Q-PCR Master Mix (Smartgene, Korea) 및 LightCycler 96 system (Roche, Switzerland)을 통하여 수행되었다. 모든 qRT-PCR 반응은 10 ㎕의 SYBR Green Master Mix, 2 ㎕의 정방향 및 역방향 프라이머, 1 ㎕의 cDNA, 7 ㎕의 nuclease-free water가 포함된 반응물로 수행되었으며, 반응 조건은 95℃/2분, (95℃/5초 - 60℃/20초) x 40회로 구성하였다.

[0043] 또한 dsRNA가 주입된 꿀벌응애 생존율을 평가하기 위해 주입 후 72시간 까지 꿀벌응애의 생존율을 확인하였다. 생존율 평가는 미세한 붓으로 꿀벌응애를 건들 때 더듬이 또는 다리가 움직이지 않는 개체를 치사 개체로 판단

하여 평가하였다.

[0044] 그 결과, *COPB2* 및 *COPD* 유전자에 대한 dsRNA 처리군에서는 24 및 48시간 째에 표적 유전자의 현저한 발현 수준 감소가 확인되었으며, *COPE* 유전자에 대한 dsRNA 처리군에서는 48시간째에 표적 유전자의 발현 수준이 현저히 감소되었음이 확인되었다(도 2). 또한, 각 유전자에 대한 dsRNA가 직접 주입된 꿀벌응애들은 무처리 대조구(untreated), 물 처리 대조구(water) 및 dsGFP 처리 대조구(dsGFP)와 비교하여 24시간 뒤부터 생존율이 급격히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0046] **실시예 3. 꿀벌에 대한 꿀벌응애 dsRNA의 섭식 독성 평가**

[0047] 꿀벌응애 dsRNA의 꿀벌에 대한 섭식 독성 평가를 위하여 3개의 dsRNA를 꿀벌에 각각 1 ㎍씩 급여한 후 24시간 후에 총 RNA를 추출하였고, 각 유전자의 발현량을 평가하였다. qRT-PCR은 SYBR Green Q-PCR Master Mix 및 LightCycler 96 system을 통하여 수행되었다. qRT-PCR 반응의 조건은 상기 실시예 2와 같으며, 꿀벌의 유전자 증폭을 위해 사용된 프라이머 정보는 하기 표 3과 같다. 꿀벌응애 dsRNA의 꿀벌 생존율 평가를 위하여 상기와 같은 방법으로 dsRNA 급여 후 24시간, 48시간 및 72시간 후의 꿀벌의 생존율을 평가하였다.

표 3

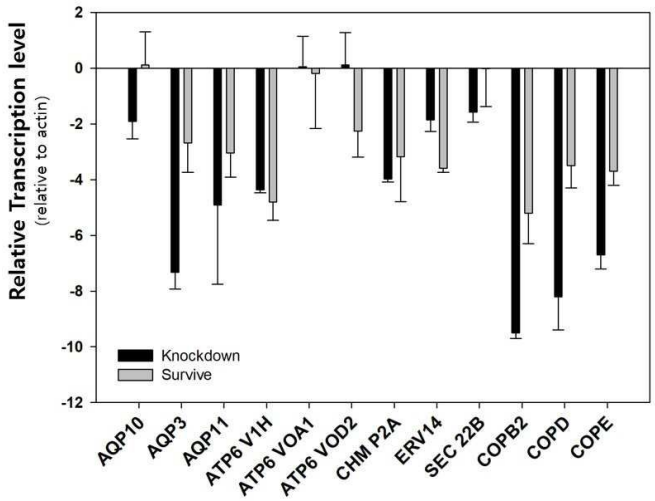
[0048] 꿀벌 유전자 특히 프라이머 정보

Target gene		Sequence (5'-3')	서열번호
COPB2	forward	GATCTCGTAACGGCACATTCT	29
	reverse	GTTTAGCACAAGAGTGTTTGCA	30
COPD	forward	CAACTCCCTTACCTACAACTGG	31
	reverse	GAATTGGTCGAGATGGTGGT	32
COPE	forward	TCCGTGTTGTGCTAGATGAAA	33
	reverse	AGAATTGCAACAAGCGACTAATC	34
Actin (internal control)	forward	TGCCAACACTGTCCTTTCTG	35
	reverse	AGAATTGACCCACCAATCCA	36

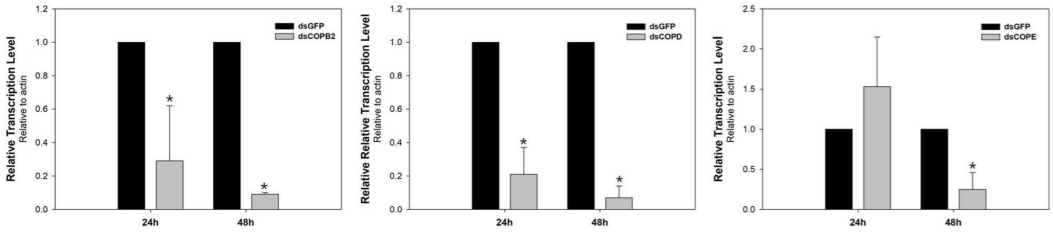
[0049] 분석 결과, 꿀벌응애 dsRNA 처리 후 꿀벌의 *COPB2*, *COPD* 및 *COPE* 유전자는 발현 수준에 감소가 나타나지 않은 것으로 확인되었으며(도 4), 꿀벌응애 dsRNA는 꿀벌의 생존율에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(도 5). 상기 결과를 통해 본 발명의 꿀벌응애 유전자 특이 dsRNA는 꿀벌에는 영향을 미치지 않으면서, 꿀벌응애만 특이적으로 치사시킬 수 있음을 알 수 있었다.

도면

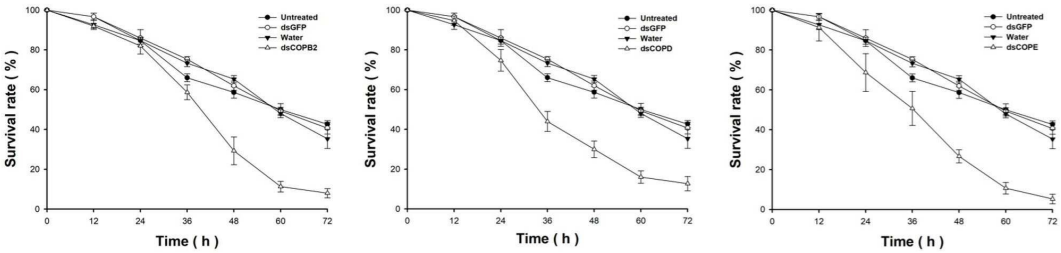
도면1



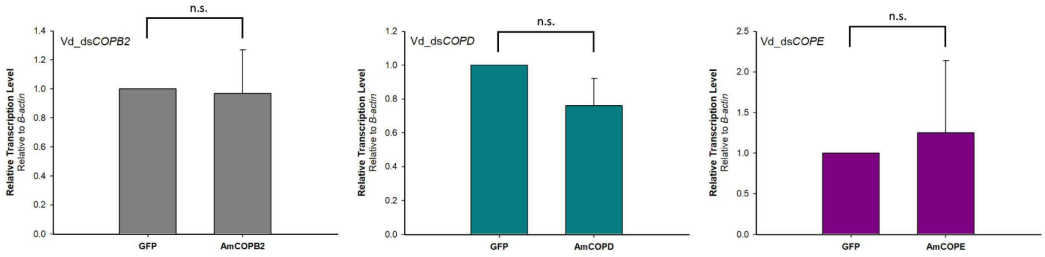
도면2



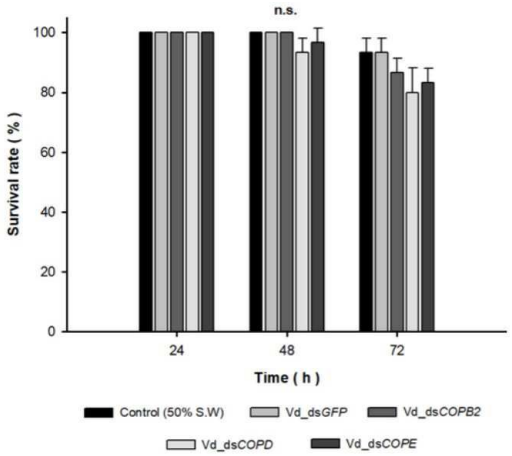
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.