

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2025-0074723
(43) 공개일자 2025년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 63/60 (2020.01) A01P 7/04 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 63/60 (2022.01)

A01P 7/04 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2023-0159331

(22) 출원일자 2023년11월16일

심사청구일자 2023년11월16일

(71) 출원인

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박홍현

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

고영호

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터 1005

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 14 항

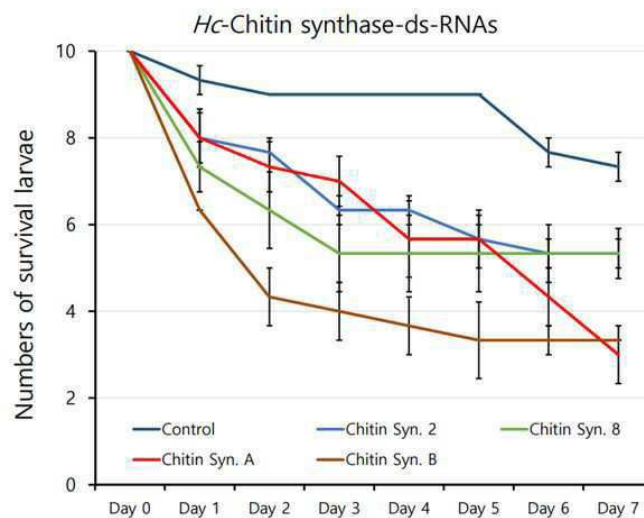
(54) 발명의 명칭 미국흰불나방 Chitin synthase 유전자들을 이용한 미국흰불나방에 살충효과가 있는 double stranded-RNAs의 제조방법 및 활용방법

(57) 요약

본 발명은, 키틴 합성효소(Chitin synthase) 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물, 농약 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 키틴 합성효소 유전자를 표적하는 dsRNA를 처리하는 경우, 미국흰불나방의 발육 억제 효과가 우수함을 확인하였는 바, 미국흰불나방의 방제에 유용하게 활용될 수 있으며, 쉽게 내성이 생기는 화학합성 살충제를 대체할 수 있는 친환경 농약으로의 응용이 가능하다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12N 9/1051 (2013.01)

C12N 9/14 (2013.01)

C12Y 204/01016 (2013.01)

C12Y 306/03014 (2013.01)

C12N 2310/14 (2025.05)

(72) 발명자

김유희

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터
1005

호앙유엔민안

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 도현연구센터
1005

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395076621

과제번호 RD009131

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 생물다양성위협외래생물관리기술개발사업(농진청)

연구과제명 침입해충 방제제의 방제효율 증대 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국립농업과학원

연구기간 2020.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

키틴 합성효소(Chitin synthase) 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 키틴 합성효소는 Chitin synthase 2, Chitin synthase 8, Chitin synthase A 및 Chitin synthase B로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 dsRNA는 서열번호 1 내지 4의 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도는 5 내지 1000 ng/ml인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase)에 대한 dsRNA를 더 포함하는, 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 상기 미국흰불나방의 성장을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달되는 것인, 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 부형제를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 수화제, 입상수화제, 액상수화제, 액제, 수용제, 수용성입제 및 캡슐화제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제형인, 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition), 식품첨가물(food additives) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 조성물.

청구항 11

청구항 1의 조성물을 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 농약.

청구항 12

청구항 1의 조성물을 식물 또는 상기 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)을 방제하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달되는 것인, 방법.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 식물은 가로수, 조경목, 과실수, 벼과, 배추과, 박과, 가지과 작물 또는 약용작물인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 키틴 합성효소(Chitin synthase) 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물 및 이를 이용한 방제방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명의 타겟 해충은 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury, Fall webworm (이하, FWW로 칭함))로 1958년도 서울 이태원의 가로수에서 처음 보고되어서, 미군 화물과 같이 유입된 것으로 추측되었다. 2012년도의 FWW 기주에 대한 연구결과를 보면 FWW은 62과 219종의 식물을 가해할 수 있다. 미국흰불나방의 기주는 식량작물들과 채소류와 특용작물과 원예작물과 조경수 등이 포함된다. 특히 최근에 들어서는 기후의 온난화로 월동 후 생존하는 개체수가 증가할 수 있는 환경으로 변화되면서, 발생이 급격히 늘어나서 심각한 문제로 대두되고 있다. 특히 아파트 단지나 공원이나 유원지등의 조경수나 가로수에서 대량 발생을 하면 사람들에게 혐오감을 조성하고 FWW이 분비하는 web이나 배설물들에 의한 피부발진 등의 부작용을 가져올 수 있다.

[0003] 현재 FWW의 방제는 다양한 종류의 작물보호제가 허가되어 있지만, 대중이 많이 모이는 시간과 지역에는 처리가 어려운 실정이다. 그러므로, 인간이나 환경에 위해성이 없거나 적은 물질을 이용한 새로운 방제 기법의 개발이 절실히 요구된다. 또한, 작물 보호제의 피할 수 없는 중요한 문제점은, 다른 곤충 종이나 환경에 대해서도 비특이적인 독성이 있다는 점과, 동일한 작물 보호제를 반복적으로 사용하는 경우 저항성 계통이 나타날 수 있다는 것이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 작물 보호제와는 다른 방법으로 미국흰불나방을 제어할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

[0004] 한편, 생명체 내에서 중요한 기능을 하는 유전자에 대한 double stranded RNA(ds-RNA)가 세포 내로 들어가면 dicer라는 효소에 의하여 21~23 bp의 small interference RNA(siRNA)로 변형된다. 이러한 siRNA들을 RNA-induced silencing complex(RISC)가 인지하여 결합한 후, 100% 동일한 서열을 가지는 mRNA와 결합 및 분해를 유도하여 단백질 발현을 억제하게 하는데, 이러한 현상을 RNA 간섭(RNA interference, RNAi)라 한다.

[0005] 이러한 RNAi 기술을 이용하면 상기와 같은 종래 방제법의 문제들을 해결할 수 있으므로, 곤충의 체벽 형성을 조절하는 중요한 효소인 Chitin synthases에 대한 ds-RNA를 제작하여 siRNA를 유도함으로써, 미국흰불나방에 대한 종 특이적 방제기법을 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2226556호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은, 키틴 합성효소(Chitin synthase) 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물 및 농약을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은, 상기 조성물을 식물 또는 상기 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)을 방제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 키틴 합성효소(Chitin synthase) 유전자를 표적하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예로, 상기 키틴 합성효소는 Chitin synthase 2, Chitin synthase 8, Chitin synthase A 및 Chitin synthase B로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 dsRNA는 서열번호 1 내지 4의 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물내 dsRNA의 농도는 5 내지 1000 ng/ml일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase)에 대한 dsRNA를 더 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 상기 미국흰불나방의 성장을 억제하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달되는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 부형제를 더 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 수화제, 입상수화제, 액상수화제, 액제, 수용제, 수용성입제 및 캡슐화제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition), 식품첨가물(food additives) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 농약을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 식물 또는 상기 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예로, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 식물은 가로수, 조경목, 과실수, 벼과, 배추과, 박과, 가지과 작물 또는 약용작물일 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명에 따르면, 키틴 합성효소 유전자를 표적하는 dsRNA를 처리하는 경우, 미국흰불나방의 발육 억제 효과가 우수함을 확인하였는 바, 미국흰불나방의 방제에 유용하게 활용될 수 있으며, 쉽게 내성이 생기는 화학합성 살충제를 대체할 수 있는 친환경 농약으로의 응용이 가능하다.
- [0024] 또한, 본 발명의 dsRNA 단편은 중 특이성이 높으므로 본 발명의 dsRNA로 형질전환된 식물은 이상적인 미국흰불나방 방제 모델이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은, 미국흰불나방 방제용 dsRNA를 제작하기 위한, 4종류의 Chitin synthase 목표 유전자에 대한 PCR 증폭 결과이다.
- 도 2는, 미국흰불나방 방제용 dsRNA의 정량을 위한, dsRNA 표준곡선(standard curve)이다.
- 도 3은, T7 RNA polymerase의 양의 차이에 따른 dsRNA 합성량을 비교한 결과이다.
- 도 4는, 효율적인 dsRNA의 합성을 위한 최적의 rNTP 농도를 확인한 결과이다.
- 도 5는, 효율적인 dsRNA의 합성을 위한 template DNA 양을 확인한 결과이다.
- 도 6은, 본 발명의 dsRNA를 섭취한 미국흰불나방 유충의 발육 저해 효과를 확인한 결과이다.

도 7은, 본 발명의 dsRNA의 미국흰불나방 유충에 대한 살충 효과를 확인한 결과이다.

도 8은, 본 발명의 dsRNA mixture의 미국흰불나방 유충에 대한 살충 효과를 뽕나무에서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명의 일 양상은 키틴 합성효소(Chitin synthases)를 표적으로 하는 dsRNA를 포함하는, 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 방제용 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 용어 "Chitin synthase"는 곤충의 체벽의 주요 구성요소인 chitin을 생성하는 효소로서, 곤충의 성장과 변태에서 매우 중요한 역할을 하는 효소이다.
- [0028] 상기 용어 "dsRNA(double stranded-RNA)"는 센스(sense) 및 안티센스(antisense)가 결합된 것으로, 실질적으로 상보적인 2개의 핵산 가닥을 포함하는 이중체(duplex) 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 의미한다. 상기 dsRNA는 세포 내로 도입시, 단일 가닥으로 분리되어 siRNA의 형태로 표적 전사 RNA에 결합하여, 전사 RNA를 분해 시켜서 단백질이 합성되는 것을 방해한다.
- [0029] 상기 용어 "상보적"은 두 가닥의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건 하에 혼성화하여 이중체 구조를 형성할 수 있는 능력을 의미한다.
- [0030] 상기 용어 "미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)"은 1958년도 서울 이태원의 가로수에서 처음 보고되어서, 미군 화물과 같이 유입된 것으로 추측되는 해충으로, 2012년도의 FWW 기주에 대한 연구결과를 보면 FWW은 62과 219종의 식물을 가해 할 수 있다. 흰불나방의 기주는 식량작물들과 채소류와 특용작물과 원예작물과 조경수 등이 포함된다. 특히 최근에 들어서는 기후의 온난화로 월동 후 생존하는 개체수가 증가를 할 수 있는 환경으로 변화되면서, 발생이 급격히 늘어나서 심각한 문제로 대두되고 있다
- [0031] 상기 용어 "방제"란 작물에 피해를 주는 각종 병해충 또는 미생물을 예방하고 구제하는 것을 의미한다.
- [0032] 일 양상에 있어서, 키틴 합성효소는 Chitin synthase 2, Chitin synthase 8, Chitin synthase A 및 Chitin synthase B로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0033] 일 양상에 있어서, 상기 dsRNA의 서열은 서열번호 1 내지 4의 염기서열로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0034] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도는 5 내지 1000 ng/ml, 5 내지 500 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 10 내지 500 ng/ml, 10 내지 100 ng/ml, 15 내지 1000 ng/ml, 15 내지 500 ng/ml 또는 15 내지 100 ng/ml일 수 있다.
- [0035] 일 양상에 있어서, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도가 5 ng/ml 미만인 경우, 미국흰불나방의 방제 효과가 유효하게 나타나지 않을 수 있고, 상기 조성물 내 dsRNA의 농도가 1000 ng/ml 초과인 경우, 미국흰불나방의 방제에 비경제적일 수 있다.
- [0036] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 V-ATPase(Vacuolar-type H⁺-ATPase)에 대한 dsRNA를 더 포함할 수 있다. 이때, V-ATPase는 ATP를 에너지원으로 이용하여 H⁺를 이동시켜 세포막과 세포 소기관막의 안쪽과 바깥쪽 간의 전위차를 만들어내는 효소를 의미한다.
- [0037] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 상기 미국흰불나방의 성장을 억제하는 것일 수 있다.
- [0038] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달되는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 용어 "유충"은 곤충의 미성숙한 아성체를 의미하고, 내시류 곤충에 있어서는 내시류 곤충이 번데기가 되기 전의 모습을 의미한다.
- [0040] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 부형제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 부형제는 미생물 농약에 사용되는 것을 특정의 것에 한정하지 않고 사용할 수 있으므로, 부형제에 관한 설명은 생략하기로 한다. 일례로, 일 양상에 따른 방제용 조성물은 실제 포장에서 사용하기 적합한 안정적인 제제화를 목적으로 생화학 농약으로 사용가능한 계면활성제 또는 증량제 등을 부형제로 사용할 수 있다.
- [0042] 예를 들어, 상기 계면활성제는 알킬(C8~C12)아릴설포네이트, 디알킬(C3~C6)아릴설포네이트, 디알킬(C8~C12)설포숙시네이트, 리그닌설포네이트, 나프탈렌설포네이트축합물, 나프탈렌설포네이트포르말린축합물, 알킬(C8~C12)나

프탈렌설포네이트포르말린축합물, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐설포네이트와 같은 설포네이트 화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬(C8~C12)설페이트, 알킬(C8~C12)아릴설페이트, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)설페이트, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐설페이트와 같은 설페이트 화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 폴리옥시알킬렌옥시네이트와 같은 옥시네이트화합물의 나트륨염 또는 칼슘염, 나트륨 벤조에이트, 알킬카르복실레이트 등의 음이온성 계면활성제, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)에테르, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐에테르, 폴리옥시에틸렌알킬(C8~C12)페닐폴리머, 에틸렌옥사이드 프로필렌옥사이드 코폴리머와 같은 비이온성 계면활성제, 폴리카복실레이트, 트리톤 100 및 트윈 80으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

- [0043] 또한, 상기 증량제로는 벤토나이트(bentonite), 활석, 클레이, 카올린, 탄산칼슘, 규사, 경석, 규조토, 산성 백토, 제올라이트, 펄라이트, 화이트 카본, 암모늄 설페이트, 요소, 포도당, 덱스트린(dextrin), 콩가루, 쌀, 밀, 황토, 포도당 및 전분, 물 등이 단독으로 또는 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0044] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 수화제, 입상수화제, 액상수화제, 액제, 수용제, 수용성입제 및 캡슐화제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다. 이들은 공지된 방법으로 제조될 수 있고, 예를 들어, 임의로 계면활성제(유화제, 분산제 또는 포움 형성제)를 사용하여 활성 화합물을 증량제(액체 용매 또는 고형 담체)와 혼합하여 제조될 수 있다.
- [0045] 상기 용어 "수화제"란 물에 녹지않는 농약 원제를 활석이나 카올린 등의 광물질 증량제와 계면활성제를 첨가하여 분쇄한 가는 가루를 의미한다.
- [0046] 상기 용어 "수용제"란 물에 잘 녹는 농약원제와 설탕 또는 유안과 같이 물에 잘 녹는 물질을 증량제로 제조한 것을 의미한다.
- [0047] 상기 용어 "수용성입제"란 emamectin과 같은 수용성 원제와 수용성 보조제를 이용하여 입상화한 제제를 의미한다.
- [0048] 상기 용어 "캡슐화제"란 보호 매트릭스 등을 이용하여, 예민한 재료를 물리적으로 포장하는 제제를 의미한다.
- [0049] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 수간주사 조성물, 생물체제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition), 식품첨가물(food additives) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0050] 상기 용어 "수간주사"란 나무의 병을 치료하는 내과적 치료법의 일종으로 나무의 줄기에 주사를 꽂거나 구멍을 뚫어 약물이 주입될 수 있도록 하는 방법을 의미한다.
- [0051] 또한, 상기 조성물은 미량 영양소, 천연 원소, 천연 오일 추출물 등을 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 용어 "미량 영양소"는 극히 적은 양이기는 하나 식물의 생육에 없어서는 안 될 원소를 의미하고, 예를 들어, 아연, 철, 망간, 구리, 보론, 코발트, 바나듐, 셀레늄, 실리콘, 니켈 등이 있다.
- [0053] 상기 용어 "천연 원소"는 인공적인 핵반응으로 새로 생성된 원소가 아닌 것을 의미하고, 예를 들어, 테크네튬, 프랑슘, 아스타틴 등이 있다.
- [0054] 상기 용어 "천연 추출물"은 정제된 단일 성분들에 비하여 많은 세부 성분들이 섞여서 존재하는 혼합물을 의미한다.
- [0055] 상기 용어 "식품 첨가물"은 식품공전에 등록이 되어 있는 사카린나트륨(saccharin sodium)을 포함한 6백가지 이상의 인간의 식품에 사용이 허가된 물질들을 의미한다.
- [0056] 본 발명의 다른 양상은 상기 조성물은 식물 또는 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 미국흰불나방을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0057] 상기 "조성물", "미국흰불나방", "방제" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0058] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 섭식을 통해 상기 미국흰불나방의 유충에 전달되는 것일 수 있다.
- [0059] 일 양상에 있어서, 상기 식물은 미국흰불나방의 모든 기주 식물 특히 뽕나무와 양버즘나무 등의 가로수와, 조경목과 사과나무 등을 포함한 과실수와, 벼과, 배추과, 박과 또는 가지과 작물과 약용작물들일 수 있다.
- [0060] 상기 용어 "기주 식물"은 미국흰불나방이 섭식할 수 있는 모든 식물을 의미하며, 62과 219종에 달하는 식물이다.

- [0061] 상기 용어 "조경목"은 조경을 위하여 공원, 놀이동산, 강변, 천변, 아파트 단지나 도로 주변에 식재하는 식물들이다
- [0062] 상기 용어 "과실수"는 사과나 배나 포도나 감 등을 포함한 열매를 맺는 나무들이다
- [0063] 상기 용어 "약용작물"은 인삼이나 당귀나 도라지 등을 포함한 한약의 제조나 건강식품의 제조 또는 개인이 건강 증진 용도로 섭취하는 식물들이다.
- [0064] 상기 용어 "벼과"는 벼목에 속하는 과로 고등 식물 중 가장 큰 과의 하나를 의미하고, 예를 들어, 벼, 밀, 옥수수, 수수 등이 있다.
- [0065] 상기 용어 "배추과"는 십자화목의 과를 의미하고, 예를 들어, 배추, 겨자 등이 있다.
- [0066] 상기 용어 "박과"는 박목의 과를 의미하고, 예를 들어, 박, 오이, 수박, 참외, 수세미 등이 있다.
- [0067] 상기 용어 "가지과"는 가지목의 과를 의미하고, 예를 들어, 가지, 감자, 토마토 등이 있다.
- [0068] 일 양상에 있어서, 상기 조성물이 상기 토양에 처리되는 경우, 상기 조성물은 상기 식물의 뿌리를 통해 흡수되는 것일 수 있다.
- [0069] 또한, 상기 조성물이 상기 토양에 처리되는 경우, 상기 조성물은 증발에 의해 줄기 또는 잎 등으로 흡수되어, 상기 미국흰불나방이 상기 조성물을 섭취함으로써, 방제 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0070] 일 양상에 있어서, 상기 처리는 상기 조성물을 직접적 또는 간접적으로 처리하는 것일 수 있고, 예를 들어, 주사제를 이용하여 주사하거나, 다른 액체와 희석하여 이용하거나, 스프레이를 이용하여 분사하는 것일 수 있다.
- [0071] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0072] **실시예**
- [0073] **1. 미국흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury) 중 특이적 목표유전자 선별**
- [0074] 미국흰불나방 6령 유충에서 trizol을 이용하여 total RNA를 추출한 후, Nanodrop을 이용하여 RNA의 순도를 확인하고, RNA의 완전성은 Agilent Technologies Bioanalyzer를 이용하여 확인하였다. 확인된 RNA를 Illumina TrueSeq RNA Prep kit V2로 library를 제작하고, capillary electrophoresis로 정량 검사를 완료한 후, HISEQ2000 sequencing system으로 각각의 유전자 절편의 서열을 확인하였다. 확인된 서열들은 de novo assembly software로 유전자로 만들어 준 후, 만들어진 유전자 서열은 BLASTp searches를 진행하여 유전자들의 특성을 확인하였다.
- [0075] 이후, 다른 종들의 유전자들과 비교하여 상동성이 100%가 아닌 유전자들을 흰불나방 종 특이 목표 유전자로 선별해 연구를 진행하였다.
- [0076] **2. 목표 유전자들의 서열 확인**
- [0077] 목표 유전자(Chitin synthase) 4종의 cDNA 서열분석 결과는, 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0078]

<목표 유전자 4종의 cDNA 서열>

Name	<i>Hc</i> Chitin synthase 2
> <i>Hc</i> Chitin synthase 2	
GCAAAAGGCGACAGAACATGATCGGCTGCGTACTATGTAGTCTCTGATGCTTCTCTTTGTTCCGAGCGAAGGCTTTGATGGACGACAATGTCATGA AGAAATACACTCTGACTTCACACGAGGCCAGGCATTATGTGCAGTACGATCAAGGAGAAGACCGATGGTTATGTACATTACTGCTCCAGCGCGGCTAT CGAGTTGAGTATTCAGCCGCATCTGACGCATACACCCATTGTCCGAAAGATTGTGATGAGTCTTTAATCAACGCCGCTCGCTGGGTACCTTCCACTAT GGCTAACATCTTAGATCTGCTCGCGGACTCCAAGAGAACTATAAAGATTAATGATAACATATCTTTGTTATATGTAACATACCAGACGATGTTAATGG TTGGCACCATCTTGGGTCCCGGCACGATATTTTAATGATGATCGGTGCTATTAACGCTATCACTCAAATAAGCAACTTCAACGCTCTCATGTTGAAT CTTGTACCCATTGTTGTTTTATCATATTATTTGTCATGACTTGCAAGTCCGAAACACAGTGTTCGTTGCAAAACATAATTACTTGGCTTACGCCATGGT TATGATGTTGGTTTTGATCGGCATTGTTTTACAAATCGTGGAGGACGGCTGGACGGCACCTTCCAGTATATTTACAGTGCTACGTTTGGTATATTCT TTGTAACAGCCGCGCTACACCCTCAAGAAATAATCTGTCTACTGTATATAACTATTTATTACATAACTATCCCGAGTATGTATATGTTGCTGATTATA TACTCGTTGTGTAATTTGAACAACGTGTCTGGGGAACGAGGAGGTAGTGCAGAAGAAAACGTGTAAGGAATTAGAAATGGAACGCAAGAAGCAGA AGAACCAAGAAGAAATGCAATCACAGTTTACTGAAGTGGTTCGGCAAGTCTGAGGAAAAGAGTGGCAATCTCGAGGTAGGCGTGTCCGGCCTTT TTAAATGCATGTGTTGATGAACCTAATGACCACAAAGAAGACCTGCATTTACTTCAAATTGCCAACGCAATAGAAAAAGTTGAAAAGAGATTGGAA GCGCTTGGGGCCCTGAGATGGTTGAACCAATGACTCGTCCGCGATCTTCGGTATGAGTTCGTAAGAAGTCTGTGGACCTCTCACCATTGTACCGGA GTATTGTGACATGTGACATACAGATATACCAAGGAAGAAAGAGACGATTTGATCAACCCATACTGGATAGAAAGACCGGACCTTACGCAAGGAG AAGTAGATTTCTGACGACTGTGAGACAGAGTCTGGAAAGATCTAATTGACCTCTATCTACGGCCCATTTGACGAAAAACAAAGAGGAACTGGCTCGT ATCAAAACGGAATTTGAAGAACTTACGTGACACAGTTGATTCTCATTGTAATGCTGAACGCTCTGTTTGTGTTGGTGATCTTCTGCTACAAATGAA CCAGGACAGTGCATTTAGATGGCCTTTCGGACAAGATGTTAGCCTTTCATACGACAGTAATGGGAATTTGATCAATATAACGCAAGAATACCTAA CGCTGGAACCGATTGGATCAGTGTTCCTGTATCTTCGGGTTCGGTGATGTAATCCAGTTTACCGCAATGTTATTCATCGGCTTGGGACACTCACT CATCTACTTTCCACAACAACCTCTGAACCTGACTTCAGTAAAGGTGCAGAAGATATGTCAGAAGACGCCCTTATCCAGAAACACGCAGTTGAGATAGC GAAGGACTTGCACCGGTTGAATACAGACGATTTGGATCGACAAGGAATTAAGACGATACGTTGTCGGGAGGAAGACGATTTTCAATTTGGAGAAGG CTCGGATGCTAAACAGAACTGTTGAATCTCGATGCTAACTTCAACCGAAGTTGATCACTATTTGTCAGAATAACAGATCTCAGAGGTGATCTCCCGG CTGCCTTCCTTGGGTTCGGGACCCCGGCACGAGACGCGCAACTCTCGCGGATCCAGACGCGCCACGACTCCATCACCGGTGAGCGACGCGCTCGCA GATGCAGCCCCGAATTTACCAATGACTTCTGTTCAATGCTGATCATATTTCACTCACTGACTTGGGCGGGCGTGCTCCACTTCAGGACCTTCCT ATCTTAACCGCGGCTACGAGCTGCATTGACAGCGACGAGGACGGTCCCGTACCGCAAGGAGCACCGTACGCTTTAGAGAACAAATTCGCGTGAAGC GAATATAATGCATTTATATTACAACATGTTATTTATATCAGTTATAAAAATAAAATATTTAAGCAT	
Name	<i>Hc</i> Chitin synthase 8
> <i>Hc</i> Chitin synthase 8	
AGGAGTAAAGATGTATTTGACCATCTTGCCACCATTATATTGACTTCTGAAGTAATATTAAGAAAGAACTAGTAGAATTGTTTAACTACTTAATATAAA GTTTGTGACTCTATGGTAACTCAGTATAATTATTACCTGGACCGTCATTGCGTTCATATTGAAGAATCTCTTTTTAAAGGCCACGTCAGCGTACCA ATGTTCTCTTTTTCTGTCTTGCCCTTCTCCAAATTATGTATAGTCTTTCGCTACCGACATTGTGCGGACTTGAACCAGAGTCAATTGTCATAATCGTC ATCCAACCCGTTCAACTTCTGCAGGTCTTTACTATTGCTATTGCATTTTATCCAGTAGTGCATTGTCAGATAAATCTTCAGACTAAACAAAATTTA AAAACGTTAATAACACCCACCATATAGAAATTTATGTTAAATATTGTTGAGTAGTATTTTCTAAATCAAATCTTTACCTTCTTGAACAGAACCAGTT GAGTTCGTTAGATGCCAATATGTGTGATATGGTTCCAAATCTATGGAATAACATCGCGGAGAATTGTATGACCAAGATCAAGGCGAAGAAGAATACGA ATACTAGACCAATAGGTTCCAATTGCAAAATATCTTTTGAGATCAATACCTGGAATAACATTATACAAATATTATACATATTCGAGTTATAAGCCATT TTAAATTACAATATGTGAATTGCGCATCAGCAGATGACGCATTTATAAAGCCATTTAAATTTAAATGTTTTAAAAATAAAGTAAAAAGC	
Name	<i>Hc</i> Chitin synthase A
> <i>Hc</i> Chitin synthase A	
AGGAGTAAAGATGTATTTGACCATCTTGCCACCATTATATTGACTTCTGAAGTAATATTAAGAAAGAACTAGTAGAATTGTTTAACTACTTAATATAAA GTTTGTGACTCTATGGTAACTCAGTATAATTATTACCTGGACCGTCATTGCGTTCATATTGAAGAATCTCTTTTTAAAGGCCACGTCAGCGTACCA ATGTTCTCTTTTTCTGTCTTGCCCTTCTCCAAATTATGTATAGTCTTTCGCTACCGACATTGTGCGGACTTGAACCAGAGTCAATTGTCATAATCGTC ATCCAACCCGTTCAACTTCTGCAGGTCTTTACTATTGCTATTGCATTTTATCCAGTAGTGCATTGTCAGATAAATCTTCAGACTAAACAAAATTTA AAAACGTTAATAACACCCACCATATAGAAATTTATGTTAAATATTGTTGAGTAGTATTTTCTAAATCAAATCTTTACCTTCTTGAACAGAACCAGTT GAGTTCGTTAGATGCCAATATGTGTGATATGGTTCCAAATCTATGGAATAACATCGCGGAGAATTGTATGACCAAGATCAAGGCGAAGAAGAATACGA ATACTAGACCAATAGGTTCCAATTGCAAAATATCTTTTGAGATCAATACCTGGAATAACATTATACAAGTTATTACATATTCGAGTTATAAGCCATT TTAAATTACAATATGTGAATTGCGCATCAGCAGATGACGCATTTATAAAGCCATTTAAATTTAAATGTTTTAAAAATAAAGTAAAAAGC	
Name	<i>Hc</i> Chitin synthase B
> <i>Hc</i> Chitin synthase B	
GAGATCAATACCTCGCTGTATCTCGATGTACGTAATATTGTCTTAATCCCAAGGCCAATCCACGTGGAGTTATCTTTGTTGAGTTGCAATAA AAATACTATCAATATGAATAAAGCATTGAACATAACAAACGCAAAACGGAATTTCCGTAGCTCGACCAAAATCTCTTGAATTCGAGTCTGTAAAA AATTACAGAAAACAAATATAATAATTATGAATCAACTTCAAGGGTACTGGGATATTGGCTAGTGGTTACATGTCAGTGTCTCGAGGCACGCGTA GTCCCAAGTCATCGTTGAAGGCCGATTGTGCTGCAAGTGGAATCTACGTTACCTTCTGAGAAATCTCATCGTACGTAATATTAGTTTTTACTCCGAAG GGCCATTTAACGTGAAGGTTGCTTGTTCATTTGACAGTAAGAACAACATCAGTACAAAAAGGCATTGACCATAAAGAAGGAAAAAGCAGATGAATC TCTTAATCTTTCAATCTTGGATATACGAGCCTAAAAATTTGGGAAGATAAACAGTATGAATAACTTATTTAAATGGAGAGTAAGATAAACCTGAA AGAAAACCTGGTTAATACACCATGAAATAAACATTTTGAACATATGTTTTAGGTATTCTATGACAAATCCACACGACACTCGAAACATCATCATCAG CCTATCGTTGAATTTTAAATGATTTTATCTTTATAAATTAATAAAGCGCAAAAAAAGTACGGGCAG	

[0079]

3. 목표 유전자 PCR 증폭

[0080]

미국흰불나방의 5령 유충으로부터 total RNA를 Trizol(ThermoFisher Sci)을 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA에 DNase I을 처리하여 오염된 genomic DNA를 제거하여 실험에 이용하였다. 또한, Superscript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 제작한 후, 유전자 증폭을 위한 PCR의 주형(templat

e)으로 이용하였다.

[0081] 4종의 목표 유전자(Chitin synthase)에 대한 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 프라이머쌍의 서열은 하기 표 2에 나타내었으며, T7 RNA polymerase promoter가 없는 primer를 이용하였다.

[0082] 구체적으로, 20 μ l의 PCR 반응액에는 cDNA template 1 μ l, 한 쌍의 Primer를 각각 1 μ l 및 5x rTag PCR master mix 4 μ l를 넣고, 증류수(DW: distilled water) 13 μ l를 넣은 후 반응을 시켰다. 반응은 95℃에서 3분간 배양(incubation)시킨 후, 95℃에서 10초, 56℃에서 10초 및 72℃ 10초간씩 배양을 진행하는 것을 30 사이클 동안 반복한 후, 72℃에서 7분간 배양시킨 후 4℃에 보관하였다. PCR 반응물은 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에서 분리한 후, Neogreen을 이용하여 DNA fragment를 염색하고 촬영하였다.

[0083] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 각각 261bp, 290bp, 290bp, 267bp 크기의 DNA fragments가 증폭됨을 확인하였다.

표 2

[0084] <PCR primer 서열>

Target gene	Oligo-nucleotide sequences	
HcChitin synthase 2	F	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TCG GAC AAG ATG TTA GCC TTT CA
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TCT CAA CTG CGT GTT TCT GGA TA
HcChitin synthase 8	F	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CAT AAT CGT CAT CCA ACC CGT TC
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TCG CCT TGA TCT TGG TCA TAC AA
HcChitin synthase A	F	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CAT AAT CGT CAT CCA ACC CGT TC
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TCG CCT TGA TCT TGG TCA TAC AA
HcChitin Synthase B	F	TAATACGACTCACTATAGGGAG-TCG ACC AAA TCT CTT GCA ATT CG
	R	TAATACGACTCACTATAGGGAG-CTG CAA TTG AAC AAG GAC AAC CT

[0085] * 굵게 표시한 서열은 T7 RNA polymerase가 결합하는 서열임.

[0086] 4. 증폭된 목표 유전자들의 DNA fragment 서열 확인

[0087] 증폭된 DNA fragment들을 정제한 후, 증폭된 DNA fragment들의 서열을 확인한 결과, 목표 유전자와 그 서열이 동일함을 capillary sequencing을 통해 확인하였다.

[0088] 구체적으로, 정제된 PCR product들을 주형(template)으로 이용하고, T7-promoter를 가진 primer쌍을 이용하여 Template DNA를 증폭하였다. 20 μ l의 PCR 반응액에는 증폭된 DNA template 1 μ l, 한 쌍의 T7-promoter primer를 각각 1 μ l 및 5x rTag PCR master mix 4 μ l를 넣고, 증류수(DW: distilled water) 13 μ l를 넣은 후 반응을 시켰다. 반응은 95℃에서 3분간 배양시킨 후, 95℃에서 10초, 68℃에서 10초 및 72℃ 10초간씩 배양을 진행하는 것을 30 사이클 동안 반복한 후, 72℃에서 7분간 배양시킨 후 4℃에 보관을 하였다.

[0089] PCR 반응물은 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에서 분리한 후, Neogreen을 이용하여 DNA fragment를 염색하고 촬영하였다. 증폭된 T7-promoter를 포함한 DNA fragment들을 정제한 후, Capillary sequencing을 수행하여, T7-promoter sequence의 존재 여부를 확인하였다. 그 결과, 4종의 모든 PCR product는 T7-promoter sequences를 5'말단과 3'말단에 가지고 있음을 확인하였다.

[0090] 5. 미국흰불나방 방제용 dsRNA 제작

[0091] T7-promoter를 가진 증폭된 DNA fragment를 주형(template)으로 이용하고, T7-promoter 서열을 포함하고 있는 목표 유전자의 primer를 이용하고, MEGAscript RNAi Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific)를 이용하여 dsRNA를 제작하였다.

[0092] 구체적으로, 2 μ g의 template DNA에 4 μ l의 10x T7 reaction buffer, 4 μ l의 ATP solution, 4 μ l의 CTP solution, 4 μ l의 GTP solution, 4 μ l의 UTP solution 및 4 μ l의 T7 Enzyme mix를 넣고, 증류수를 추가하여 40 μ l로 만든 후, 잘 혼합하고 quick spin으로 용액을 튜브로 모은 후 37℃에서 8시간 또는 20시간 동안 반응을 시킨다. 그 후, DNA를 제거하고 dsRNA만을 분리하기 위해, dsRNA 합성 용액 20 μ l에 5 μ l의 digestion buffer 및 2 μ l의 DNaseI을 처리한 후, 증류수를 추가하여 총 50 μ l로 만든 후, 37℃에서 1시간동안 반응을 시킨다. 합성된 dsRNA를 분리하기 위해 dsRNA를 흡착하는 필터카트리지(filter cartridge)에 용액을 잘 섞어서 넣은 후, 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 이후, 에탄올(Ethanol)이 포함된 세척 용액 500 μ l로 두 번 세척한 후,

50 μ l의 추출 용액으로 두 번 추출하였다. 분광 광도법(Spectrophotometer)을 이용하여 dsRNA의 농도를 측정 한 후, 1.25 ml를 2% 아가로스 겔(Agarose gel)에 분리하여 dsRNA의 크기를 확인하였다.

[0093] 이때, 목표 유전자 4종에 대하여, 최종적으로 얻어진 dsRNA의 서열은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0094] <목표 유전자 4종에 대한 dsRNA 서열>

Name	Hc Chitin synthase 2 (서열번호 1)
>Hc Chitin synthase 2 ds-RNA sequence 1500 ~ 1760	
TCGGACAAGATGTTAGCCTTTTCATACGACAGTAATGGGAATTTGATCAATATAACGCAAGAATACCTAACGCTGGAACCGATTGGATCAGTGTTCCTTGTATTCCTCGGGTCGGTGATGTTAATCCAGTTTACCGCAATGTTATCCATCGGCTTGGGACACTCACTCATCTACTTTCCACAACAACCTCTGAACGTGTAACCTCAGTAAAGGTGCAGAGATATGTCAGAAAGACGCCCTTATCCAGAAACACGCAGTTGAGA	
Name	Hc Chitin synthase 8 (서열번호 2)
>Hc Chitin synthase 8 ds-RNA sequence 285 ~576	
CATAATCGTCATCCAACCCGTTCAACTTCTGCAGGTCCTTTACTATTGCTATTGCATTTTATCCAGTAGTGCATTGTCAGATAAATCTTCAGACTAAACAAAAATTTAAAAACGTTAATAACACCCACCATATAGAAATTTATGTTAAATATTGTGGTAGTAGTTTTCTAAATCAAATCTTTACCTTCTTAGAACAGAACCAGTTGAGTTCCGTAGATGCCAATATGTGTGATATGGTTCCAAATCTATGGAATAACATCGCGGAGAATTGTATGACCAAGATCAAGGCGA	
Name	Hc Chitin synthase A (서열번호 3)
>Hc Chitin synthase A ds-RNA sequence 285 ~ 576	
CATAATCGTCATCCAACCCGTTCAACTTCTGCAGGTCCTTTACTATTGCTATTGCATTTTATCCAGTAGTGCATTGTCAGATAAATCTTCAGACTAAACAAAAATTTAAAAACGTTAATAACACCCACCATATAGAAATTTATGTTAAATATTGTGGTAGTAGTTTTCTAAATCAAATCTTTACCTTCTTAGAACAGAACCAGTTGAGTTCCGTAGATGCCAATATGTGTGATATGGTTCCAAATCTATGGAATAACATCGCGGAGAATTGTATGACCAAGATCAAGGCGA	
Name	Hc Chitin synthase B (서열번호 4)
>Hc Chitin synthase B ds-RNA sequences 163 ~ 430	
TCGACCAAATCTCTTGCAATTCGAGTCTGTAAAAAATTACAGAAAACAAATATAATAATTATTGAATCAACTTTCAAGGGTGACTGGGATATTGGCTAGTGGTTACATGTCTAGTGTCTCGAGGCACGCGTAGTCCCAAGTCATCGTTGAAGGCCGATTGCTGCAAAGTGGAAGTCTCACGTTACCTCTTGAGAAATCTCATCGTACGTAATATTAGTTTTTACTCCGAAGGGCCATTAAACGTGAAGGTTGTCCTTGTTCATTGTCAG	

[0095] 추가로, 최적의 dsRNA 합성 조건을 얻기 위하여, 하기와 같이 합성조건을 바꾸어 가면서, 생성되는 dsRNA의 양을 측정하였다.

[0096] 5-1. dsRNA 정량

[0097] 우선, 정확한 dsRNA의 양을 측정하기 위하여, 정제된 dsRNA를 동결건조하고 정밀저울로 무게를 측정한 후, Tris-HCl buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 100 ng/ul의 농도로 dsRNA 표준 용액을 제조하였다. 제조된 dsRNA 표준 용액을 100 ng에서 500 ng 까지 100 ng 차이로 agarose gel에서 전기영동을 수행하여 분리한 후, 각각의 band의 밝기를 측정하였다.

[0098] 측정된 밝기를 0.5 kbp DNA marker 밴드의 밝기를 이용하여 표준화를 진행을 한 후 표준곡선(dsRNA standard curve)을 도출하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0099] 5-2. dsRNA의 생성을 위한 최적의 T7 RNA polymerase 용량 결정

[0100] 최적의 T7 RNA polymerase의 용량을 얻기 위하여, T7 RNA polymerase를 100 unit, 50 unit, 20 unit, 10 unit, 5 unit, 3.3 unit, 2.5 unit, 2 unit을 2 ul 10 x T7 RNA polymerase buffer와 0.5 ul의 1 M DTT와 4 ul rNTP (25 mM rATP 25 mM rCTP, 25 mM rGTP, 25 mM rUTP)와 template DNA 1000 ng을 혼합 한 후 dH₂O를 보충하여 20 ul의 최종 반응액을 만든 후, 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다. 반응 후, template DNA를 제거하기 위하여 5 ul의 10 x DNase I buffer와 20 unit의 DNase I을 혼합 한 후, dH₂O를 보충하여 50 ul의 최종 반응액을 만든 후, 37℃에서 30분간 반응시켰다.

[0101] 최종 반응물은 Phenol-Chloroform-isoamylalcohol mixture (Merck)를 이용하여 단백질을 제거한 후, 3 M sodium acetate (pH 7.5)는 전체 회수한 용액 양의 1/10만큼, 그리고 100% 에탄올은 전체 회수한 용액 양의 2.5배를 추가한 후 -20℃에서 1시간 동안 침전시킨 후, 원심분리기로 4℃에서 14,000 rpm으로 30분간 회전시켜서 dsRNA를 침전시켰다. 침전된 dsRNA는 dH₂O로 녹인 후 일정량을 Agarose gel에 로딩하여 농도를 확인하였다.

[0102] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, T7 RNA polymerase의 양의 차이에 따른 dsRNA(*Hc*-Chitin synthase)의 생성량은 100 내지 5.0 unit을 사용시 통계적으로 차이가 없었다. 3.3 unit을 사용한 경우에는, 통계적으로 100 unit을 사용한 경우에만 차이가 있고, 감소되는 비율도 20% 정도에 불과하였다. 또한, 2.5 unit 이하에서는 dsRNA의 생성량이 유의하게 감소하였다.

[0103] 따라서, dsRNA 생성량과 투입되는 T7 RNA polymerase의 양을 고려하면, 3.3 unit의 T7 RNA polymerase를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0104] 5-3. dsRNA의 생성을 위한 최적의 rNTP양 결정

[0105] T7 RNA polymerase 3.3 unit과 2 ul 10 x T7 RNA polymerase buffer와 0.5 ul의 1 M DTT와 template DNA 1000 ng을 rNTP의 양을 4 ul (5 mM rATP 5 mM rCTP, 5 mM rGTP, 5 mM rUTP in 20 ul 용액)에서 2 ul (각각 2.5 mM rNTP), 0.8 ul (각각 1.0 mM rNTP), 0.4 ul (각각 0.5 mM rNTP), 0.2 ul (각각 0.25 mM rNTP), 0.12 ul (각각 0.15 mM rNTP), 0.1 ul (각각 0.125 mM rNTP), 0.08 ul (각각 0.1 mM rNTP)를 혼합한 후 dH₂O를 보충하여 20 ul의 최종 반응액을 만든 후, 위에 언급한 방법으로 dsRNA를 합성하고 정제를 진행하였다.

[0106] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, rNTP의 농도가 각각 5 mM 또는 2.5 mM인 경우 생성되는 dsRNA 양에는 통계적인 차이가 없었으나, 1 mM 이하의 농도에서는 매우 적은 양의 dsRNA가 합성됨을 알 수 있었다.

[0107] 따라서, 4종의 rNTP를 각각 2.5 mM 농도로 혼합하는 것이, dsRNA 생성을 측면에서 가장 바람직함을 알 수 있다.

[0108] 5-4. dsRNA의 생성을 위한 최적의 Template DNA 양 결정

[0109] T7 RNA polymerase 3.3 unit과 2 ul 10 x T7 RNA polymerase buffer와 0.5 ul의 1 M DTT와 2 ul의 rNTP (2.5 mM rNTP each)에 더하여, template DNA를 1000 ng, 500 ng, 200 ng, 100 ng, 또는 50 ng을 혼합한 후 dH₂O를 보충하여 20 ul의 최종 반응액을 만든 후, 위에 언급한 방법으로 dsRNA를 합성하고 정제하였다.

[0110] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 1000 내지 200 ng의 template DNA를 넣어준 경우에는 dsRNA 생성량에 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는, template DNA를 200 내지 500 ng 정도 사용하면 효율적인 dsRNA의 합성이 가능함을 보여준다.

[0111] 6. 미국흰불나방 유충에 대한 발육 저해 효과

[0112] 실시예 5에서 제작한 dsRNA를, 1 g의 누에사료(대한잠사회)에 5 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 20 ng/ml 농도로 혼합하여, 야외에서 채집한 미국흰불나방 2령 유충에 먹인 후, 7일 후에 유충의 무게를 측정하여 발육상태를 확인하였다.

[0113] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 처리한 4종의 dsRNA 종류간에는 발육억제 효과에 큰 차이가 없지만(Two-way ANOVA, $F_{(3, 11)} = 1.725$, $P = 0.261$), dsRNA의 농도는 미국흰불나방의 발육에 영향을 미침을 확인하였다(Two-way ANOVA, $F_{(2, 11)} = 43.489$, $P = 0.0003$).

[0114] 즉, 20 ng의 dsRNA 처리군들은 5 ng 또는 10 ng 처리군에 비하여 미국흰불나방의 체중이 유의하게 감소됨을 보여주었다.

[0115]

[0116] 7. 미국흰불나방 살충효과

[0117] 실시예 5에서 제작한 dsRNA를, 250 ng/ml 농도로 증가시킨 후, 미국흰불나방에 대한 살충 효과를 7일 동안 관찰하였다.

[0118] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 4종의 Chitin synthase에 대한 dsRNA들은 모두 미국흰불나방의 생존을 저해시켜주며, 그 중에서도 Chitin synthase A와 Chitin synthase B에 대한 dsRNA의 경우, 대조군(미처리군) 보다 뛰어난 살충효과를 보여주었다.

[0119] 8. Chitin synthase B와 V-ATPase G에 대한 dsRNA 혼합물의, 뽕나무에서 미국흰불나방 방제효과

[0120] 실시예 5에서 제작한 Chitin synthase B의 dsRNA와 V-ATPase G의 dsRNA를 각각 0.2 mg씩 100ml의 수돗물에 섞어서 dsRNA 혼합물(mixture)을 준비하였다. 분무 처리 하루 전에, 총 15그루의 뽕나무에 각각 50마리의 미국흰불나방 2-3령 유충을 접종하였다. 5그루의 뽕나무를 각각 무처리군(Con)과 수돗물 처리군(Tap Water)과 dsRNA

mixture 처리군으로 나눈 후 분무를 진행하였다.

[0121] 이때, V-ATPase G 유전자에 대한 dsRNA의 서열은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0122]

Name	<i>Hc</i> V-ATPase G (서열번호 5)
> <i>Hc</i> V-ATPase G ds-RNA sequence 251~ 523 AGGCAATTCAAAGAGTTTGAGGCCAAGCACATGGGTACCAGGGAAGGTGTGGCTGCCAAGATTGAGGCCGAGACTAGAGTGAAGATCGATGAGA TGAACAGAATGGTGAACAGCAACAGGAGCCCGTGATCAAAGACATTCCTAGCTTGGTGTACGACATTAAGCCCGAGCTCCATGTTAACTACCG CTTCTAGTAAACATATATGTTATATAATGAAATATTAATTACCATCTGTTGTGCGGTATTAAACGCTTGCAATCACCTTAGTTG	

[0123] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 분무 처리 4일 후에 dsRNA mixture를 분무한 뽕나무 군에서 살충효과가 무처리군(Con) 또는 수돗물 처리군(Tap Water)에 비하여 현저히 뛰어남을 알 수 있었다.

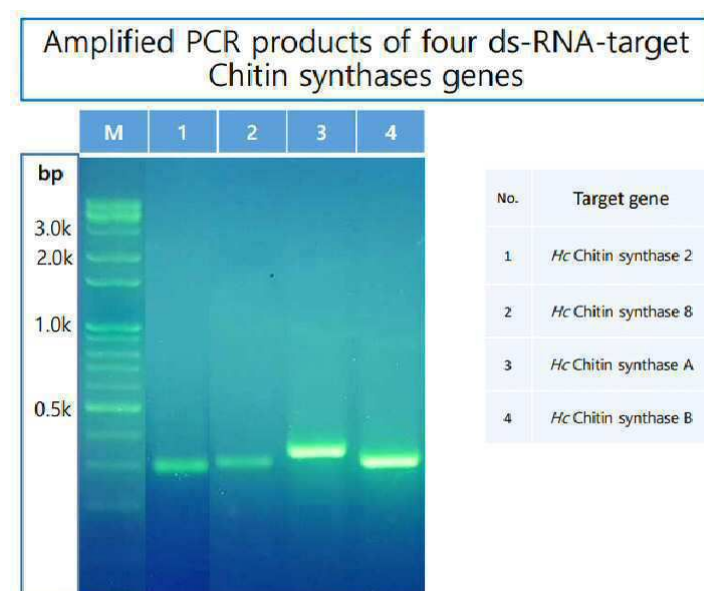
[0124] 무처리군의 경우 미국흰불나방의 생존률이 $98.8 \pm 0.4\%$ 였고, 수돗물 처리군의 생존률은 $75.2 \pm 9.09\%$ 로 통계적인 차이는 없었다. 하지만, dsRNA mixture 처리군의 경우는 생존률이 $16.4 \pm 4.32\%$ 로 통계적으로 유의하게 감소를 하였다 (One Way ANOVA: $F_{(2, 12)} = 21.247$, $P = 0.00014$). 무처리 대조군의 살충률을 이용하여 보정 살충률을 계산하면, 수돗물 처리군은 23.9이었고, dsRNA mixture 처리군은 66.8이었다.

[0125] 상기와 같은 결과들은, 본 발명의 4종의 Chitin synthase 목표 유전자에 대한 dsRNA들이, 미국흰불나방의 방제에 효과적으로 이용될 수 있음을 의미한다.

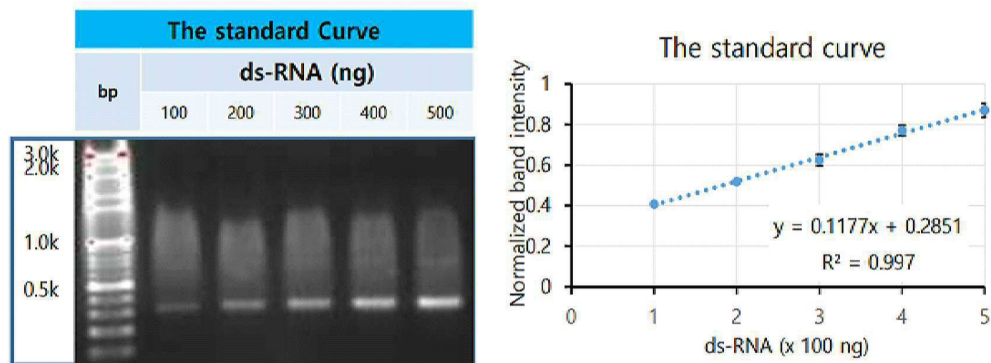
[0126] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

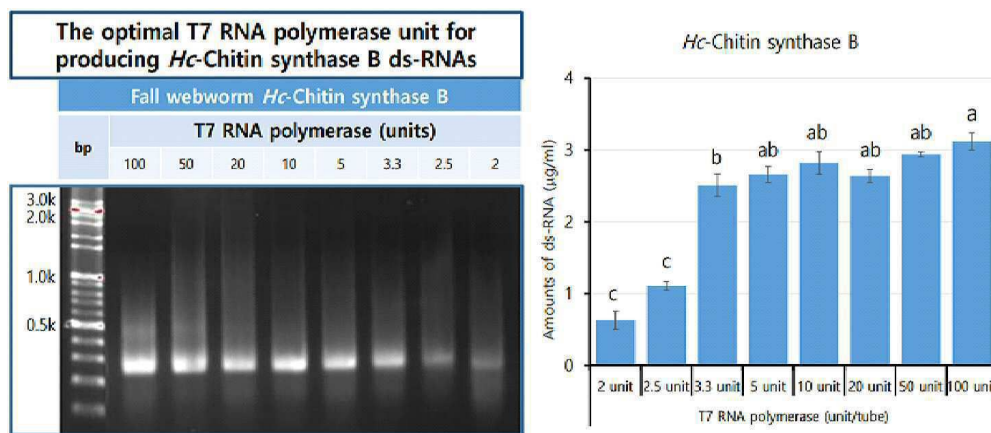
도면1



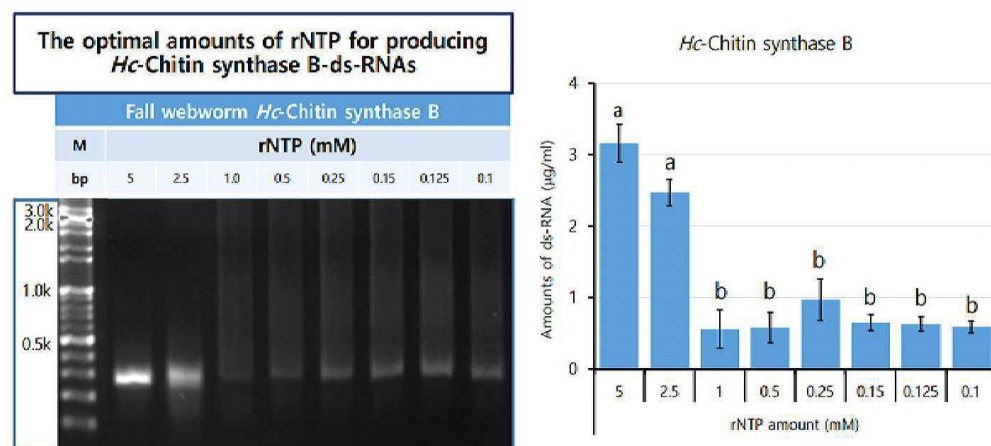
도면2



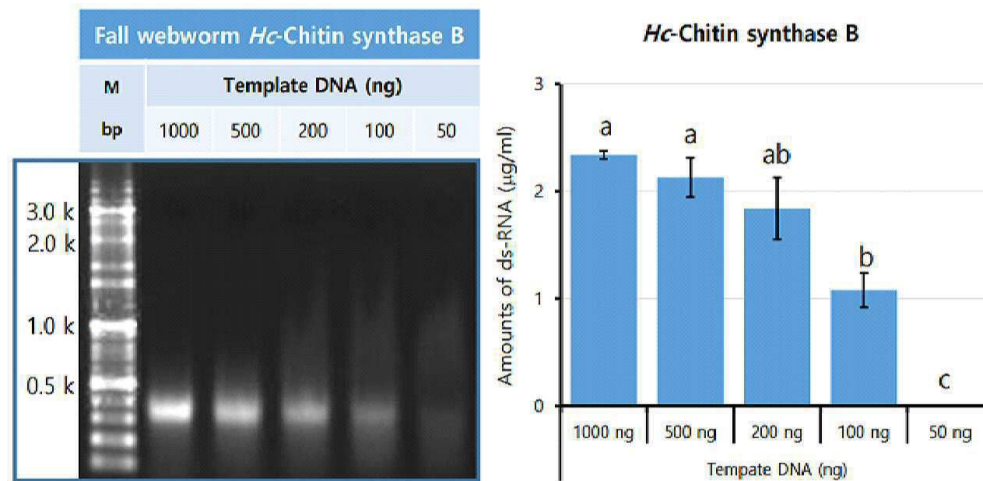
도면3



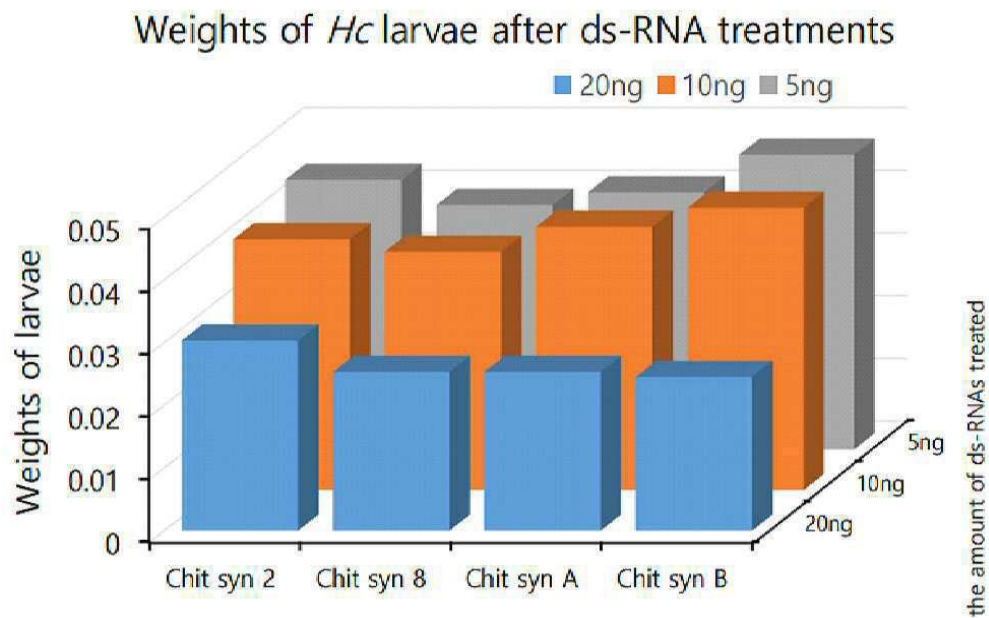
도면4



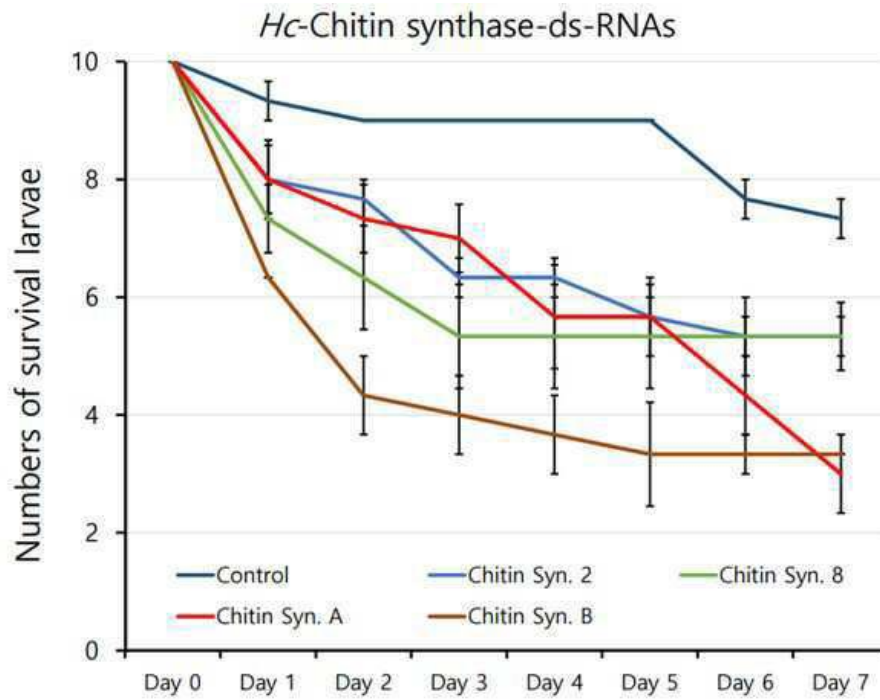
도면5



도면6

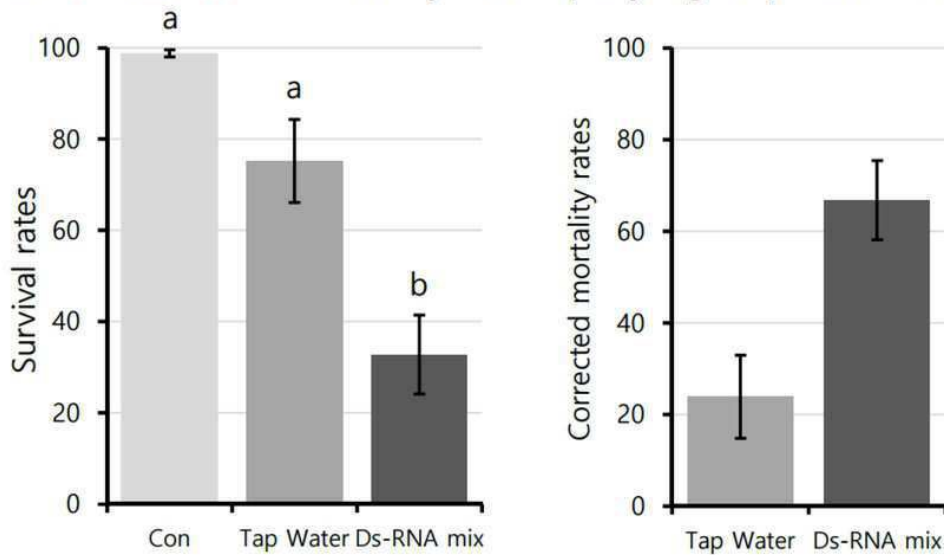


도면7



도면8

FWW infected Mulberry tree spraying experiments



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.