

**해양바이러스 병원체 진단키트 실용화 기술 개발**

**Development of practical diagnostic techniques for  
marine viral pathogens**

**2016. 12.**

**한 국 해 양 과 학 기 술 원**

# 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양바이러스 병원체 진단키트 실용화 기술 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2016년 12월

연구책임자: 이택건

참여연구원: 박소윤, 김명옥, 윤람디, 황진익

# 초 록

연구사업명	기업수요 맞춤형 실용화 기술개발	과제유형	응용
연구과제명	해양바이러스 병원체 진단키트 실용화 기술 개발		
연구책임자	이택건		
연구기관명	한국해양과학기술원 남해특성연구센터		
연구기간	2016. 07. 01. - 2016. 12. 31. (6개월)		
연구비	238,000,000원		
요약		보고서 면수	36
<p>가. 사업목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ LAMP 기반 해양바이러스 진단키트 시제품 제작</li> <li>○ scFv 기반 해양바이러스 병원체 진단키트 시제품 제작</li> </ul> <p>나. 주요 사업내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ LAMP 프라이머 specificity 및 sensitivity 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적의 LAMP 프라이머 조합 선별 및 실시간 PCR 장비를 이용한 검출법으로 개선</li> </ul> </li> <li>○ Bst polymerase 활성 검증               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 등온반응에 사용되는 중합효소를 이용한 반응 조건 확립</li> </ul> </li> <li>○ 시제품 사양, 검출한도, 현장적용성 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 양식장 어류 조직에서 LAMP기법 이용한 해양바이러스 검출 확인</li> </ul> </li> <li>○ 4종의 해양바이러스 검출용 진단키트 시제품 제작               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Real-time LAMP PCR 진단키트 제작</li> </ul> </li> <li>○ RSIV 및 NNV coat protein 대응 scFv 항체 유전자 형질전환 및 대량생산</li> <li>○ 항체 활성 및 발색화 기법 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- TMB를 이용한 최적의 발색 조건 확립</li> </ul> </li> <li>○ ELISA 검출용 시제품 사양 확인               <ul style="list-style-type: none"> <li>- scFv displayed phage를 이용한 시제품 제작</li> <li>- 양식장 어류 조직의 단백질 추출물에서 해양바이러스 검출 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>다. 기대효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전자 정보를 기반으로 한 해양병원체 진단기술 확보</li> <li>○ 해양바이오산업 중 해양병원체 진단시장 선점</li> </ul>			
색인어	한글	해양병원체, 해양바이러스, 진단키트	
	영어	Marine pathogen, Marine virus, Diagnostic kit	

# 목 차

초 록.....	i
목 차.....	ii
표 목차.....	iv
그림목차.....	v

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구개발 추진 배경 및 필요성

1. 개발기술 내용.....	1
2. 개발기술의 국내외 기술동향.....	3
3. 기술의 특징.....	4
4. 연구개발의 필요성.....	7

### 제 2 절 연구개발의 목표

1. 연구개발의 목표.....	8
2. 세부목표.....	9

## 제 2 장 연구개발의 내용

### 제 1 절 LAMP 기반 해양바이러스 진단키트 시작품 제작

1. 해양바이러스 유전자 프라이머 합성.....	10
2. 바이러스 cDNA 합성과정 간소화.....	10
3. 검출에 사용되는 형광시약.....	12
4. 양식장 어류를 이용한 진단키트 테스트.....	14

### 제 2 절 scFv 기반 해양바이러스 진단키트 시작품 제작

1. phage display scFv를 이용한 진단키트 시작품 제작.....	19
2. scFv ELISA 진단키트 시작품 2종.....	20
3. 바이러스 특이 phage display scFv kit를 이용한 바이러스 진단.....	21

### 제 3 장 연구개발의 성과의 우수성

#### 제 1 절 기술의 완성도

#### 제 2 절 연구결과의 우수성/혁신성/차별성

- 1. SYTO-9을 이용한 Real-time LAMP PCR 검출방법.....24
- 2. scFv 기반 항체 대량 생산 및 항원-항체 반응조건 최적화.....24

#### 제 4 장 활용가능성 및 파급효과

- 1. 연구결과의 활용성 및 실용성.....25
- 2. 해당 기술의 기술적 파급효과 및 기대효과.....25
- 3. 연구결과에 대한 기업 만족도 및 사업화 계획.....25

#### 제 5 장 부록

- 1. 논문게재 성과.....26
- 2. 특허성과.....26
- 3. 해양바이러스 검출키트 시작품 프로토콜.....26

# 표 목 차

표 1. gDNA 제거 조성.....	10
표 2. 거제 연안 60개 정점 해수 환경 분석 결과.....	11
표 3. Reverse Transcription 조성.....	12
표 4. LAMP PCR 혼합물 조성.....	11
표 5. LAMP PCR 조건.....	11
표 6. Real-time LAMP PCR 조성.....	13
표 7. Real-time LAMP PCR 조건.....	13
표 8. 실험에 사용된 어종과 조직.....	21

# 그림 목 차

그림 1. 핵산 기반 해양병원체 진단기술.....	1
그림 2. 유전자 재조합 항체 기반 해양병원체 진단기술.....	2
그림 3. Melting array kit.....	3
그림 4. VNNV, MABV, VHSV, RISV LAMP 검출방법.....	5
그림 5. 해양바이러스 진단시스템 비교.....	6
그림 6. 우리나라 연도별 어병발생 현황.....	7
그림 7. 양식 넙치 주요 질병 달력.....	7
그림 8. LAMP PCR 후 전기영동 결과.....	12
그림 9. LAMP PCR 산물 SYTO-0 형광검출 결과.....	12
그림 10. 제작된 Real-time LAMP PCR 진단키트 시작품 4종.....	13
그림 11. 2016년 8월 양식 어류 샘플 사진.....	14
그림 12. 2016년 10월 양식 어류 샘플 사진.....	14
그림 13. 2016년 8월 양식 어류 RSIV 분석 결과.....	15
그림 14. 2016년 8월 양식 어류 VNNV 분석 결과.....	15
그림 15. 2016년 8월 양식 어류 MABV 분석 결과.....	16
그림 16. 2016년 10월 양식 어류 RSIV 분석 결과.....	17

그림 17. 2016년 10월 양식 어류 VNNV 분석 결과.....	17
그림 18. 2016년 10월 양식 어류 MABV 분석 결과.....	18
그림 19. Phage scFv를 이용한 antigen ELISA 모식도.....	19
그림 20. 제작된 scFv ELISA 진단키트 시제품 2종.....	20
그림 21. scFv ELISA 결과.....	21
그림 22. 등 근육 조직 진단 결과.....	22
그림 23. 장 조직 진단 결과.....	23



# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발 추진 배경 및 필요성

### 1. 개발기술 내용

#### □ 양식생물 질병유발 해양바이러스 병원체 진단시스템

##### ○ 메타분석을 통한 양식장 해수 내 고위험 병원체 발생 진단

- 생물학적 요인의 잠재적 위해성에 대한 인식이 확산됨에 따라 정밀한 해양바이러스 검출 및 진단기술 개발
- 메타분석을 통해 주요 양식어종 질병유발 해양바이러스 진단키트 개발 우선순위 결정
- 양식생물 안전성평가를 위한 표준화된 해양바이러스 진단프로토콜 확립

#### □ 핵산 및 항체 기반 해양병원체 진단키트 개발

##### ○ 핵산 기반 진단키트

- 핵산기반 진단기술은 정교하고 정확한 진단이 가능한 반면, 제한된 실험 공간에서 전문적인 장비를 이용해야만 하는 단점을 가지고 있기 때문에 일반적인 PCR 진단법에 비해 검출시간을 단축시키고 민감도를 크게 향상시킬 수 있는 고리 매개 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 추가 개발하여 해양바이러스 검출에 적용

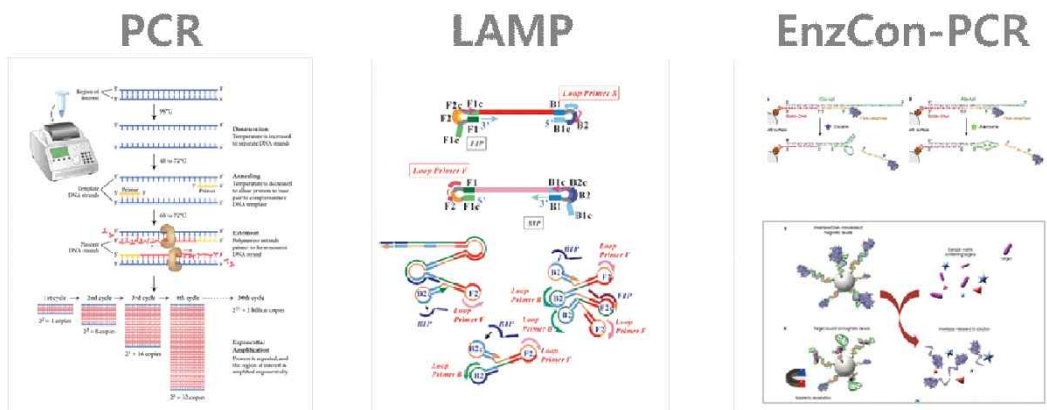


그림 1. 핵산 기반 해양병원체 진단기술

##### ○ 항체 기반 혈청학적 진단법

- 전통적으로 다중클론 및 단일클론 항체를 생산하여 해양병원체를 진단하는 기법이며, 효소면역정량법(Enzyme Linked Immunosorbent assay, ELISA)으로 분석함.

- 전통적인 혈청학적 기술에 기반한 다중클론 및 단일클론 항체를 활용한 진단기술은 현장에서 빠르고 간편하게 병원체를 진단할 수 있는 장점이 있지만, 저농도로 존재하는 병원체의 경우와 유사한 병원체를 정확하게 구분하기 위해서는 기존의 항체를 이용할 수 없음.
- 이러한 한계를 극복하기 위해서 항체공학 기술에 기반하여 유전자 재조합 항체를 선별하여 병원체를 빠르고 쉽고 정확하게 진단할 수 있는 기술 개발이 필요함. 선형 해양병원체 연구사업에서 유전자 재조합 항체 scFv(single-chain variable fragment)를 이용하여 해양병원체를 검출하고자 하는 연구가 수행되어, 참돔이리도바이러스(RSIV), 신경괴사바이러스 (NNV) 등 일부 해양바이러스에 대한 scFv 항체 개발이 완료되어 대량생산을 준비 중임.
- 특히 유전자 재조합 항체는 대장균에서 대량 생산이 가능하다는 또 다른 장점이 있어 저비용으로 대량 생산이 가능하며, 병원체 진단을 위한 항체 개발 연구는 키메라 항체 및 합성 항체 개발까지 연구영역이 확장할 수 있음.

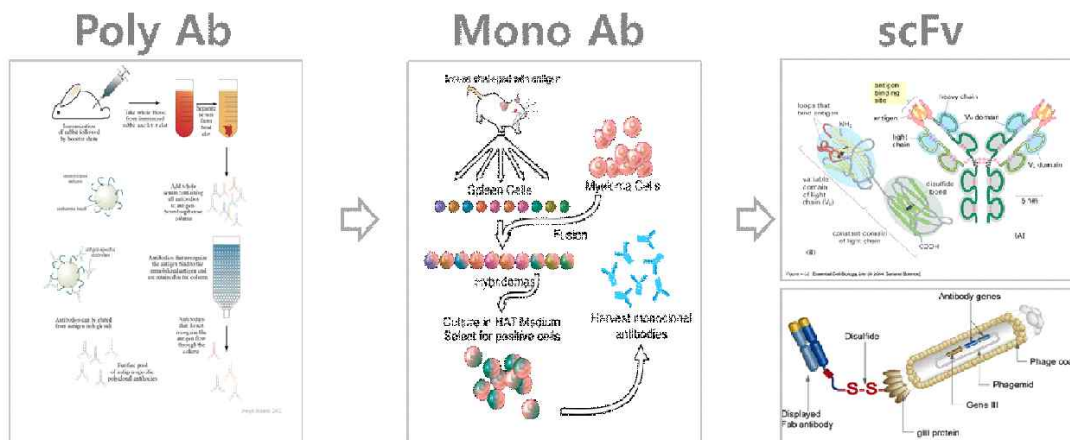


그림 2. 유전자 재조합 항체 기반 해양병원체 진단기술

## □ 해양병원체 정밀 진단키트 실용화

### ○ 유전자 및 재조합 항체 기반 진단키트 실용화 방안 도출

- 현장적용성 진단키트 개발
- 진단키트의 수산물 양식 현장적용성 검증
- 기술이전을 통한 사업화 추진

## 2. 개발기술의 국내·외 기술동향

### □ 국내 해양병원체 진단키트 기술동향

#### ○ 양식 생물 질병 진단키트 개발

- 양식 어종의 질병 원인균을 종합적으로 진단하고 병의 진행 정도를 추적 관리할 수 있는 기술 개발을 위하여 기존의 바이러스 질병의 무증폭 정량 진단키트를 최적화하고 실용하는 연구가 진행된 바 있음.
- 중합효소연쇄반응을 하지 않고, Hybridization & ELISA 방법을 혼합하여 질병의 정도에 따라 형광의 정도를 변하게 하여, 정확한 병명과 진행 정도를 알 수 있는 진단 키트 개발이 시도됨.

#### ○ 다중진단 현장용 키트 개발

- 비특이 반응을 효과적으로 억제하여 높은 민감도를 구현함으로써 동시에 여러 가지 병원체를 진단하는 형태의 다중 진단키트 개발이 시도되고 있으나, 해양병원체를 대상으로한 다중진단 현장용 키트는 상용화되지 못한 실정임.

#### ○ 수산생물전염병 유전자 진단키트

- 최근 국립수산과학원이 개발한 수산생물전염병 유전자 진단키트는 전염병 1차 검사에 양성으로 의심될 경우 3-7일 걸리던 최종 확진 기간을 최대 3시간 이내로 단축해 진단할 수 있다고 보고됨. 수과원은 진단키트를 산하 7개 방역센터와 지방자치단체 소속 11개 병성감정실기기관에 보급할 예정임.



그림 3. MeltingArray kit

### □ 국외 해양병원체 진단키트 기술동향

#### ○ 세계동물보건기구의 수산생물전염병 검사요령

- 유전학적 진단법으로 유전자증폭법과 염기서열분석을 사용하고 있지만 진단기간이 3-4일 정도 소요돼 신속한 방역조치에 어려움이 있음. 염기서열분석 등 진단단계를 줄이고 병원체 확진에 정확도를 높이는 신속한 진단으로 질병관리대책 수립을 마련하고자 함.

### 3. 기술의 특징(우수성)

#### □ 선행 해양병원체 관련 연구사업 결과 응용 및 확장

- 병원성 해양바이러스 진단을 위한 yest surface display 시스템 개발
  - 연구기간 2012.03.~2013. 02. / 총연구비 68백만원
  - 해양바이러스 단백질 항원을 발현하는 시스템 구축
- 해양병원체 진단 및 예찰시스템 개발 기획연구
  - 연구기간 2013.10.~2014. 04. / 총연구비 60백만원
  - 국내·외 해양병원체 연구 현황 및 향후 연구방향 설정
- 남해생태계 이머징 해양병원체 탐색 및 검출기술
  - 연구기간 2013. 01.~2015.12. / 총연구비 1,240백만원
  - 해류기인 해양병원체 탐색 및 검출기술 개발
- 기후변화에 따른 해양 세균성 병원체의 탐색기술 개발
  - 연구기간 2013. 01.~2014.12. / 총연구비 140백만원
  - 기후변화에 따른 해양박테리아 병원체 탐색 및 검출기술 개발
- 선박기인 외래 해양병원체 탐색 및 프로파일링
  - 연구기간 2015. 07.~2015.12. / 총연구비 98백만원
  - 선박평형수 유래 해양박테리아 및 바이러스 병원체 목록 작성
- 선박기인 외래 해양병원체 탐색 및 검출기술 개발 (수행예정)
  - 연구기간 2016. 06.~2016.12. / 총연구비 220백만원
  - 국제해사기구 규제 대상 박테리아 3종 진단키트 시작품제작

#### □ 국내특허

- 해양바이러스 관련 특허 (4건)
  - 이리도바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 검출방법 (특허 제10-1559287호)
  - 이리도바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 이리도바이러스 검출 (특허 제10-1557844호)
  - 노다바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 검출방법 (특허 제10-1613109호)
  - 노다바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 노다바이러스 검출방법 (특허 제10-1613113호)

□ 논문 (3편)

○ LAMP 검출방법

- Rapid and sensitive detection of iridovirus by loop-mediated isothermal amplification (*Hwang et al. 2015*)
- Efficient detection of pathogen virus in san dabs, *Paralichthys olivaceus* using loop-mediated isothermal amplification (*Hwang et al. 2016*)
- Detection of coat protein gene of nervous necrosis virus using loop-mediated isothermal amplification (*Hwang et al. 2016*)

□ 기술의 우수성

○ LAMP 검출방법

- LAMP PCR은 기존의 PCR 방법과 유사하나, 기존 PCR 방법은 변성, 접합, 및 신장의 세 단계를 반복적으로 수행하면서 유전자의 증폭을 시행하기 때문에 반응과정 중 지속적으로 온도의 변화를 필요로 하는 반면, LAMP PCR은 고정된 일정 온도에서 접합 및 신장이 가능한 장점을 가지고 있음.
- 더불어 PCR에 비해 진단 효율이 약 1000배 이상 증가하는 것이 보고되고 있으며, SYBR green 형광 염색에 의해 실시간으로 확인할 수 있는 장점을 가지고 있으므로, 현장적용이라는 측면에서 우수성이 있음.

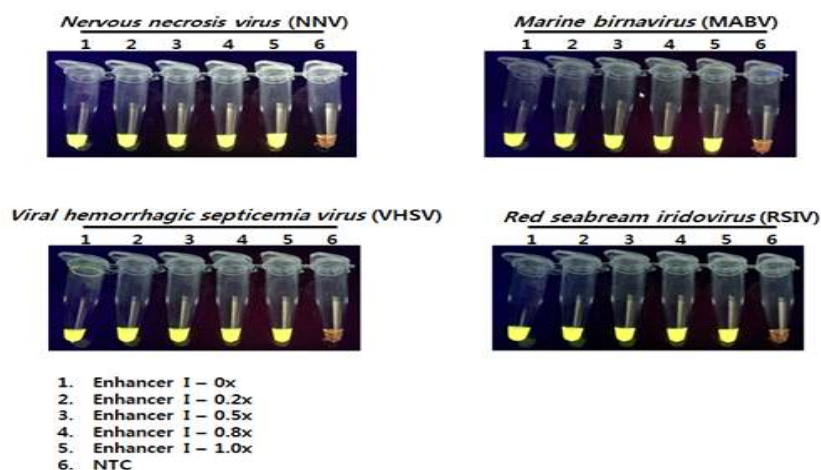


그림 4. NNV, MABV, VHSV, RSIV LAMP 검출방법]

○ 유전자재조합 항체 검출방법

- ScFv의 경우 항체 고유의 특징인 항원과 반응할 수 있는 특성을 가지고 있으며, 또한 일반적인 항체보다 작은 분자량을 가지고 있음으로써 특이성이 증가되고, 대장균이나 효모로의 형질전환을 통하여 대량생산을 할 수 있는 장점을 가지고 있음.
- $10^8 \sim 10^{10}$ 의 다양성을 가진 scFv library에서 screening을 통해 얻은 바이러스 특이 scFv는 바이러스 항원에 특이적으로 반응하며 대장균에서 대량 생산 및 유전자 engineering이 용이함
- 여러 병원체에 대한 특이적 scFv 제작기간이 항체제작기간보다 짧기 때문에 보다 유리함.
- 결과적으로 재조합 단백질인 scFv를 이용하여 병원성 해양바이러스를 검증하는데 있어서 항체와 같이 칩으로 이용하여 신속하게 검출할 수 있고 특이성 또한 증가함으로써 지금까지의 검출 방법을 능가하는 시스템을 구축 할 수 있음.



그림 5. 해양바이러스 진단시스템 비교

## 4. 연구개발의 필요성

### □ 양식생물의 집단폐사를 유발할 수 있는 해양병원체

- 국내에서 매년 해양생물의 집단폐사에 대한 보고는 있으나, 제대로 된 진단이 이루어지지 않아 폐사원인조차 파악하지 못한 사례가 많음.
- 국내 양식어류 질병 피해는 1990년대 초부터 증가하기 시작하였으나 연도별 어류질병발생 자료가 공식적으로 DB화 되어 있지 못한 실정임.
- 국립수산과학원 병리연구팀의 연구사업 및 (구)지방해양수산청의지도업무 수행을 통해 대략적인 발생상황이 취합되긴 하였으나, 추정 수치에 불과함.

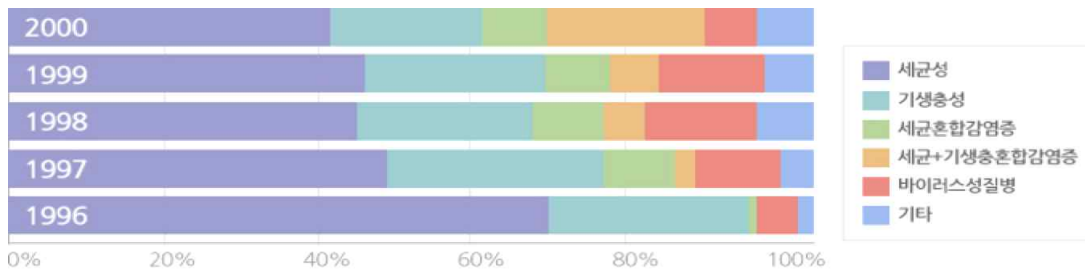


그림 6. 우리나라 연도별 어병발생 현황

- 양식장 해수 내 존재하는 해양바이러스, 박테리아 등의 해양병원체 분석을 통한 수질 모니터링 및 병원체 초기 진단시스템 필요함.

### □ 해양병원체 진단키트 상용화 및 산업화 필요

- 양식생물 질병 피해는 지속적으로 증가하는 추세이며, 제주지역 양식 넙치의 경우 연간 질병 피해액이 788억원이상으로 추산되고, 질병에 의한 폐사는 주로 종묘 및 치어에 많이 일어나 입식 종묘의 50% 이상 폐사하고 있는 실정으로 이로 인해 다양한 경제적인 문제를 초래하고 있음.
- 분자생물학적 진단기술을 이용한 양식생물질병 원인 병원체 방지대책으로 향후 경제적 손실을 최소화할 수 있을 것으로 기대됨.

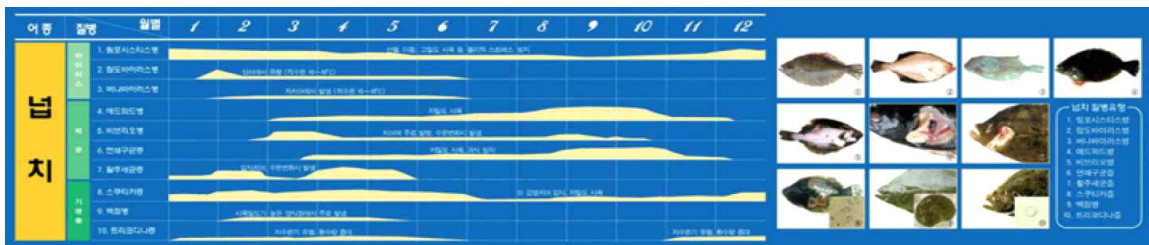


그림 7. 양식 넙치 주요 질병 달력

## 제 2 절 연구개발의 목표

### 1. 연구개발의 목표

#### □ 1차년도

- LAMP 기반 해양바이러스 병원체 진단키트 시제품 제작
  - RSIV, NNV, MABV 및 VHSV 대응 LAMP 프라이머 specificity 및 sensitivity 검토
  - Bst polymerase 활성 검증
  - 시제품 사양, 검출한도, 현장적용성 검토
  - 4종의 해양바이러스 병원체 검출용 LAMP 기반 진단키트 시제품 제작 (4종)
- scFv 기반 해양병원체 진단키트 시제품 개발
  - RSIV 및 NNV coat protein 대응 scFv 항체 유전자 형질전환 및 대량생산
  - 항체 활성 및 발색화 기법 확인
  - ELISA 검출용 시제품 사양, 검출한도 확인

#### □ 2차년도

- LAMP 기반 해양바이러스 병원체 진단키트 제품화 및 기술이전
  - 4종의 해양바이러스 병원체(RSIV, NNV, MABV 및 VHSV)의 양식 현장적용 시험
  - 진단키트 상세 프로토콜 작성 및 공인인증
  - LAMP 기반 해양바이러스 병원체 4종의 제품화기술 확립 및 기술이전
- scFv 기반 해양병원체 진단키트 제품화 및 기술이전
  - ELISA 기반 2종의 해양바이러스 병원체 (RSIV 및 NNV) 진단키트 시제품 제작
  - 진단키트의 양식 현장적용 시험
  - 항체 고정화 및 단순화 기술개발
  - 진단키트 상세 프로토콜 작성 및 공인인증
  - scFv 기반 해양바이러스 병원체 2종의 제품화기술 확립 및 기술이전



## 2. 세부목표

### □ 정량적 목표

성과지표	구체적 내용	목표	평가(검증)방법
기술스펙 (구체적 물성)*	관련기술 목표 SPEC(정량성과)		
	진단키트 시작품 성능 평가	현장적용	현장시료 검증
	진단키트 시작품 개선 및 성능 평가	현장적용	현장시료 검증
	진단키트의 최저 검출한도 제시	< 1x10 <sup>5</sup> copies	copy 수 비교
	진단키트의 비특이적 반응 제거	형광시약변경	검출조건확립
진단키트를 이용한 검사 시간 단축	3시간 이내	실시간 검증	
기술이전(건)*	(수요기업, 2017년 하반기)		
기술료수입(백만원)*	선급기술료: 80백만원, 경상기술료: 총 매출의 5%		
특허(건)	신규특허출원 (2건)		
기업성과	수요기업 기술이전 시 달성가능 성과 (매출액 등)		
시제품제작(건)	해양바이러스 4건		
기술개발/개량(건)	해양바이러스 2건		

### □ 정성적 목표

- 해양병원체 진단키트 시작품 제품화
  - 진단키트 제작 및 활용에 대한 가이드라인 제시
  - 진단키트 상세 프로토콜 작성 및 공인인증

### □ PCR 및 scFv 기반 해양병원체 진단키트 시작품 개발

- 해양바이러스 병원체 진단키트 시작품 제작 (6종)
  - LAMP 기반 해양바이러스 병원체 진단키트 (4종)
  - scFv 기반 해양바이러스 병원체 진단키트 (2종)

### □ PCR 및 scFv 기반 해양병원체 진단키트 제품화

- 해양병원체 진단키트 제품화를 위한 공정개발
  - 진단키트 상세 프로토콜 작성 및 공인인증
  - 진단키트 현장적용성 검토
  - 진단키트 시작품 성능평가 및 개선

## 제 2 장 연구개발의 내용

### 제 1 절 LAMP 기반 해양바이러스 진단키트 시작품 제작

#### 1. 해양바이러스 유전자 프라이머 합성

- 본 연구팀의 해양병원체 연구사업을 통해 확립한 LAMP-PCR 조건을 기준으로 합성함.

primer	sequence
NNV-F3	AAAGCCTCGACTGTAAGTGG
NNV-B3	TGTTTGCGGGCACATTG
NNV-FIP	ACGGCCTGGGAGATTCTCGAGTTTGGACGTGGGACCAA
NNV-BIP	CAACCATCGTCCCCGACCTCGTGTTC AACAGCGTATCGC
MABV-F3	CGAACCCCCAGGACAAAG
MABV-B3	TGCGGATGGGAGGTCAAT
MABV-FIP	GGCTTGTCGAACCCTGTTGGTATGAACAACCAGCTAGTCACC
MABV-BIP	TGGAGGACGAGACCCCAAGTGCAATTGCAGCTGTGC
VHSV-F3	AAGCCGGAATCCTTATGCC
VHSV-B3	TGCGAGCTTTCTGATGGC
VHSV-FIP	GAACACGTCATCAGGGCCCCAACTGGCCCAGACTGTCAA
VHSV-B3	CAAGAAGCTTGGGGAGCTGGCGCTTTGTCGGCGGTGAAG
RSIV-F3	CGACAATGCCGTGACCTAC
RSIV-B3	GCGAATGTAGCTGTTCTCCT
RSIV-FIP	GCCGAAATTAGCATGGCCAGTCAGACCGTGCGTAGTTCCTG
RSIV-BIP	TTAGTGTGACTGTGGCAAGGGGGACGTGATGGAGGGGATCT

표 1. LAMP PCR 프라이머 염기서열

#### 2. NNV, MABV, VHSV 3종 RNA virus의 cDNA 합성과정 간소화

- 기존의 전체 60분 과정을 20분에 가능하도록 변경함. gDNA 제거 42°C 2분, cDNA 합성 42°C 15분, RTase 불활성화 95°C 3분으로 진행.

Components	volume /reaction
gDNA Wipeout Buffer, x7	2 µl
Template RNA, up to 1 µg*	variable
RNase-free water	variable
Total reaction volume	14 µl

표 2. gDNA 제거 조성

Components	volume /reaction
Reverse Transcriptase* (Reverse-transcription master mix)	1 $\mu$ l
RT Buffer, x5 <sup>†‡</sup>	4 $\mu$ l
RT Primer Mix <sup>‡</sup>	1 $\mu$ l
Template RNA entire genomic DNA elimination reaction (step 3)	14 $\mu$ l
Total reaction volume	20 $\mu$ l

표 3. Reverse Transcription 조성

- LAMP-PCR 혼합물을 아래와 같은 조건으로 LAMP-PCR 진행. PCR 증폭산물을 1% Agarose gel 에 전기영동하여 확인함.

Components	volume /reaction
BST polymerase	1 $\mu$ l
BST Buffer, x10	2 $\mu$ l
LAMP primer Mix*	4 $\mu$ l
10mM dNTP	0.5 $\mu$ l
Template (cDNA or positive control)	2 $\mu$ l
Sterile D.W	10.5 $\mu$ l
Total reaction volume	20 $\mu$ l

표 4. LAMP-PCR 혼합물 조성

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	step
62°C	1min	1	BST polymerase activation
62°C	80min	1	LAMP PCR 반응
80°C	5min	optional	BST polymerase inactivation
4°C	infinite		Sample 보관

표 5. LAMP-PCR 조건

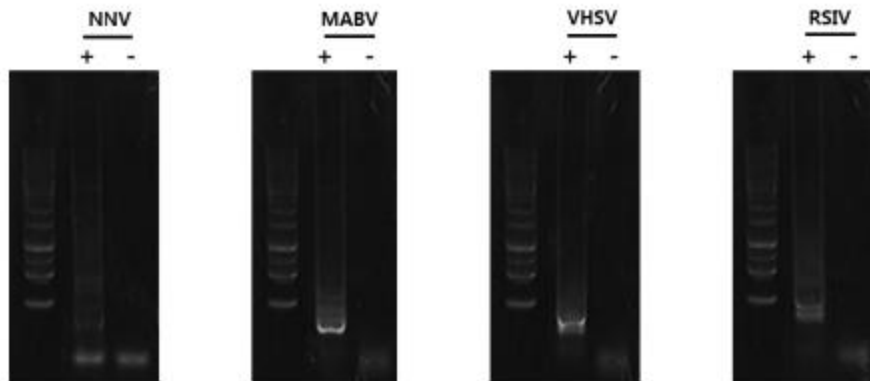


그림 8. LAMP PCR 후 전기영동 결과, 1% Agarose gel

### 3. 검출에 사용되는 형광시약 변경

- Real-time LAMP PCR 방법을 도입하기 위해 형광 시약을 SYTO-9으로 변경함. LAMP-PCR을 이용하여 증폭된 산물의 형광 시그널을 관찰하기 위해 SYTO-9 시약을 첨가하여 UV 램프로 확인.

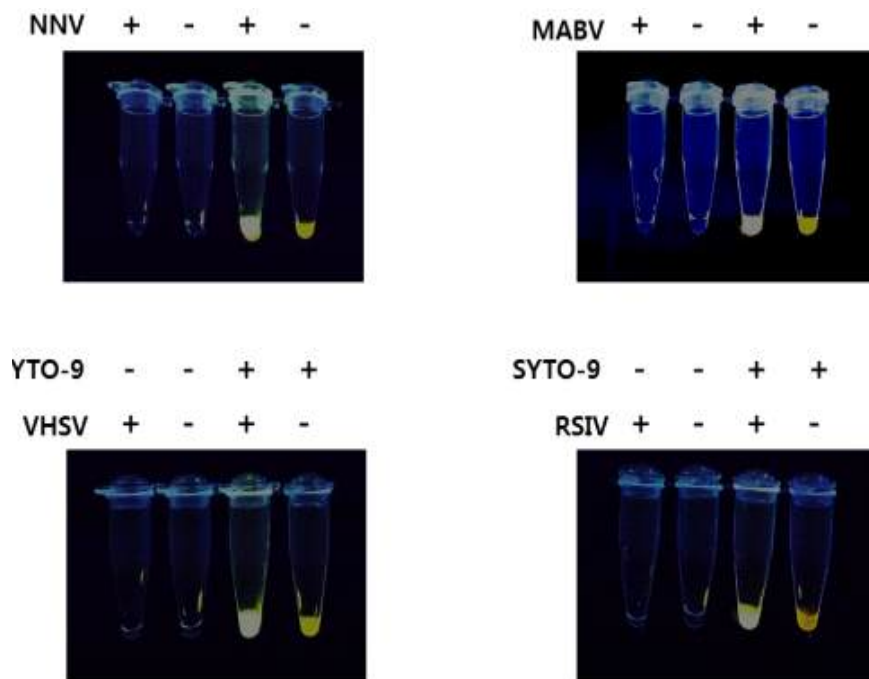


그림 9. LAMP PCR 산물 SYTO-9 형광 검출 결과

- 반응혼합물에 dNTP 양을 증가, SYTO-9 을 첨가하여 혼합물을 만들어 Real-time PCR machine 으로 Real-time LAMP PCR 수행함. Real-time LAMP PCR 방법으로 실시간 형광 시그널이 감지됨을 확인.

Components	Volume /reaction
BST polymerase	1 $\mu$ l
BST Buffer, x10	2.5 $\mu$ l
NNV LAMP primer Mix*	5 $\mu$ l
10mM dNTP	3.5 $\mu$ l
0.5mM SYTO-9	0.2 $\mu$ l
Template (cDNA or positive control)	2 $\mu$ l
Sterile D.W	10.8 $\mu$ l
Total reaction volume	25 $\mu$ l

표 6. Real-time LAMP PCR 조성

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	step
63°C	1min	1	BST polymerase activation
63°C	80sec	45	Fluorescence detection
63°C	45sec	1	

표 7. Real-time LAMP PCR 조건

1. Real-time LAMP PCR kit  
*Nervous necrosis virus (NNV)*



2. Real-time LAMP PCR kit  
*Marine birnavirus (MABV)*



3. Real-time LAMP PCR kit  
*Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)*



4. Real-time LAMP PCR kit  
*Red seabream iridovirus (RISV)*



그림 10. 제작된 Real-time LAMP PCR 진단키트 시제품 4종

#### 4. 양식장 어류를 이용한 Real-time LAMP PCR 진단키트 테스트

- 어류 조직을 액체질소로 얼려 멸균된 막자와 막자사발을 이용하여 균질화함.
- Patho Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON)를 이용하여 균질화한 조직으로부터 RNA를 추출함.
- Real-time LAMP PCR의 현장 적용 가능성을 확인해보기 위해 8월, 10월 통영 양식장 어류를 이용해 실험을 진행함.
- 8월 조피볼락 6마리, 볼락 3마리, 쥐치 2마리의 아가미, 등 근육, 장 조직으로 분리하여 실험을 진행함. 조피볼락 1~3은 살아있는 개체였고, 4~6은 죽어있는 개체임.
- 10월 참돔 5마리, 조피볼락 3마리, 감성돔 3마리의 아가미, 등 근육, 장 조직으로 분리하여 실험을 진행함. 참돔 1~2은 성어이고, 3~5은 치어였음.



그림 11. 2016년 8월 양식 어류 샘플

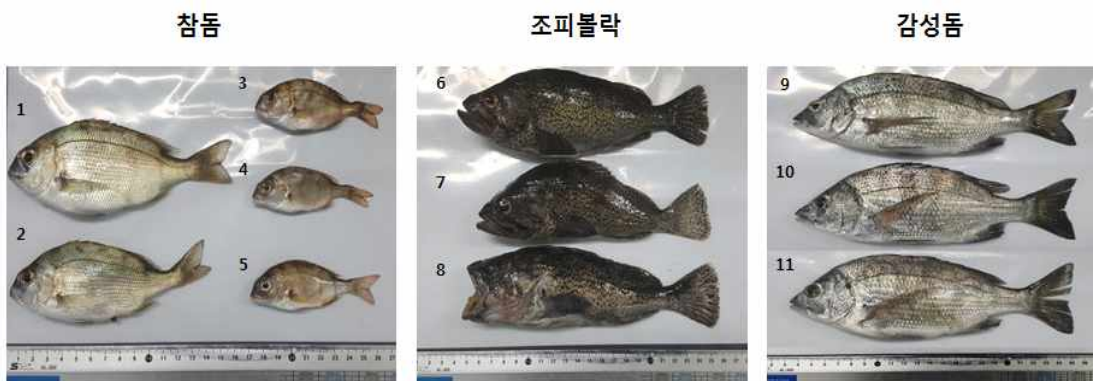


그림 12. 2016년 10월 양식 어류 샘플

- 각각의 sample에 대하여 Real-time LAMP PCR 실험을 진행 후 월 별, 부위 별로 나누어 분석함.

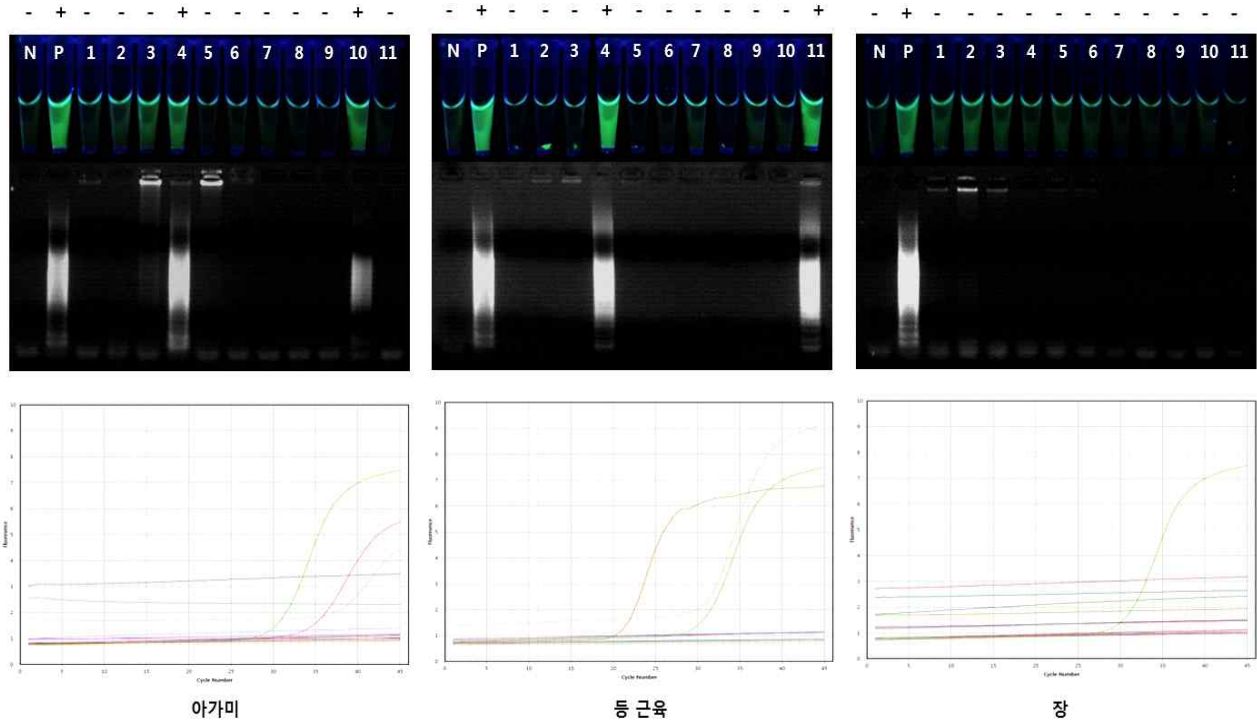


그림 13. 2016년 8월 양식 어류 RSIV 분석 결과

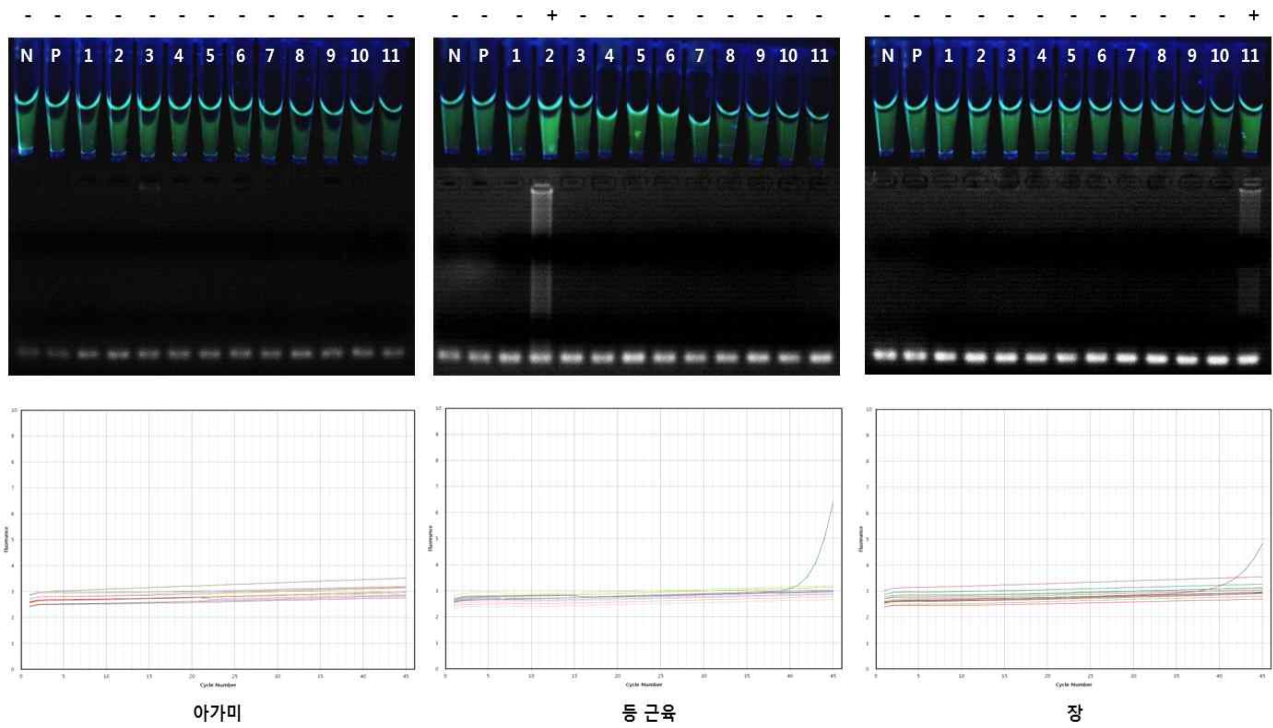


그림 14. 2016년 8월 양식 어류 VNNV 분석 결과

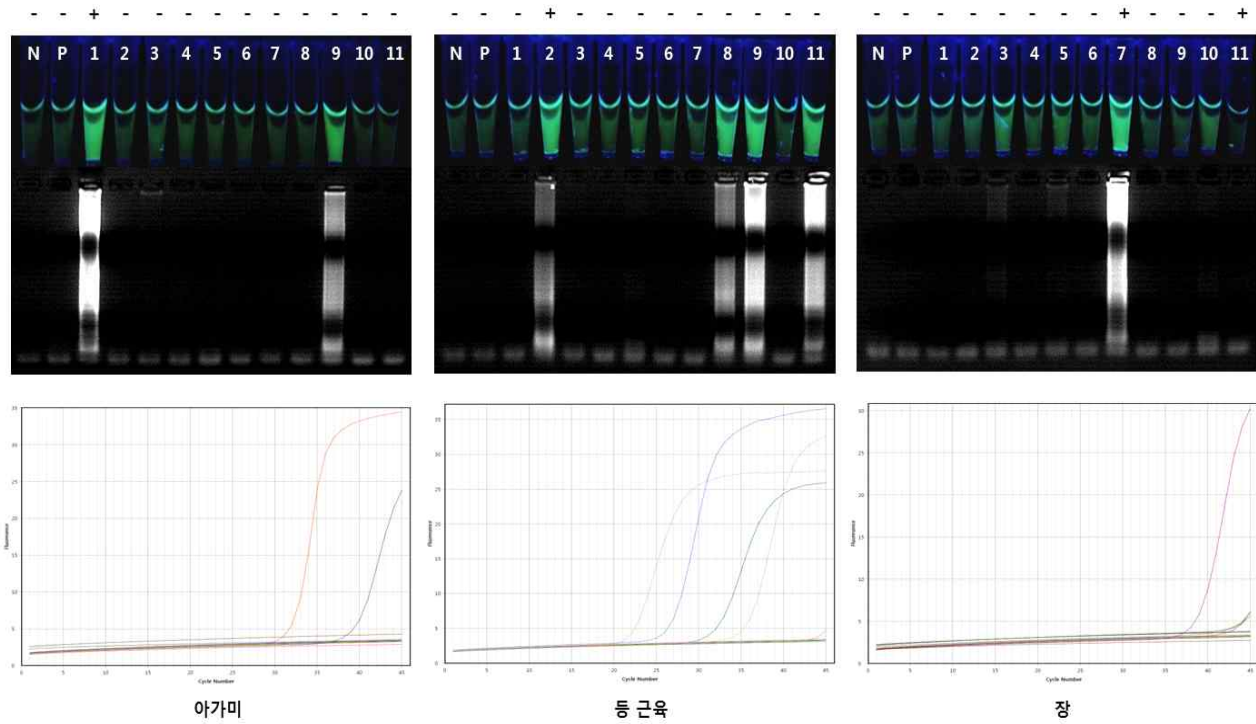


그림 15. 2016년 8월 양식 어류 MABV 분석 결과

- 8월 RSIV 진단 결과 개체는 다르지만 아가미와 등 근육에서 같은 감염률을 보였고 장에서는 검출되지 않았고, 살아있던 개체에서는 감염이 나타나지 않은 반면 죽어있던 개체에서 RSIV가 검출됨.
- 8월 VNNV 진단 결과 아가미에서 검출되지 않았고, 등 근육과 장에서 같은 감염률을 보임.
- 8월 MABV 진단 결과 모든 조직에 감염되어 있었고, 등 근육, 아가미, 장 순으로 높은 감염률을 보임.
- 8월 양식어류 진단 결과 3종의 해양 병원성 바이러스 중 MABV가 가장 많이 검출되었고 그 다음으로 RSIV, VNNV 순으로 검출되었음.
- 어종별로 비교해보면 쥐치에 가장 많은 바이러스가 감염되어있었고, 다음으로 조피볼락의 감염률이 높았음. 볼락의 경우 해양 병원성 바이러스 3종 모두에 감염되어있지 않았음.



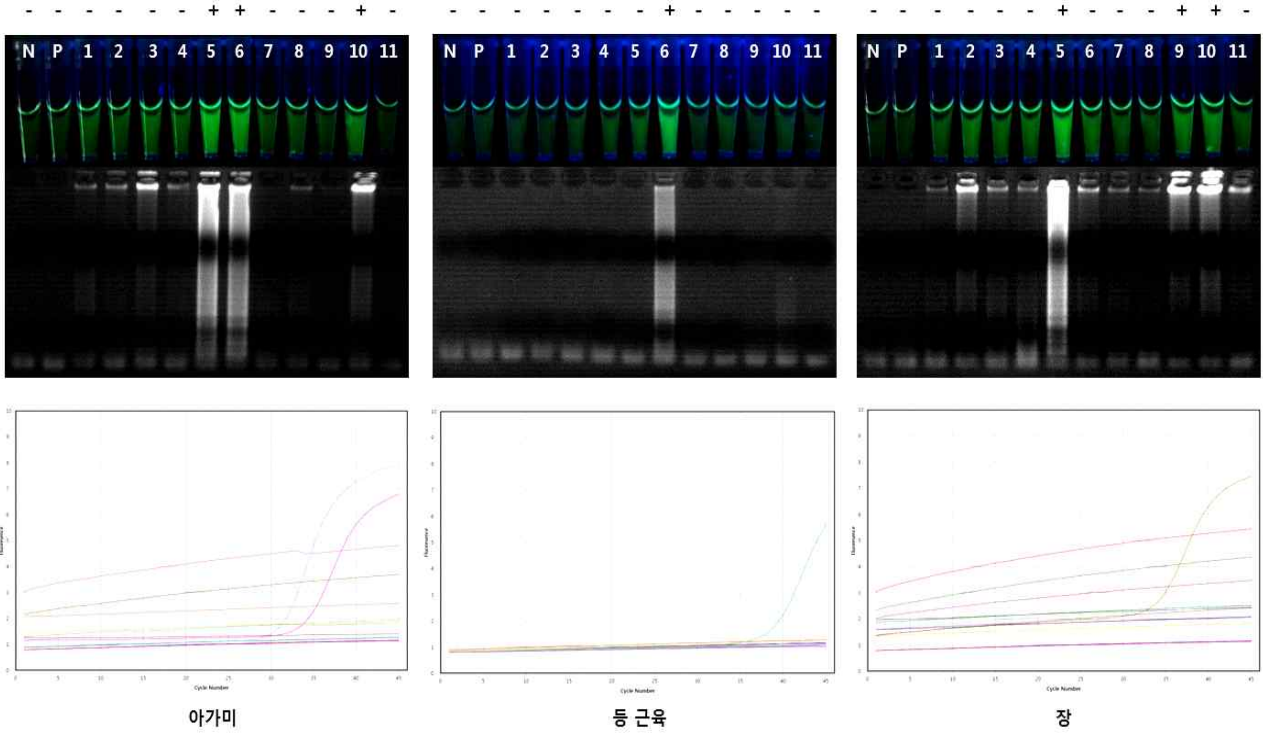


그림 16. 2016년 10월 양식 어류 RSIV 분석 결과

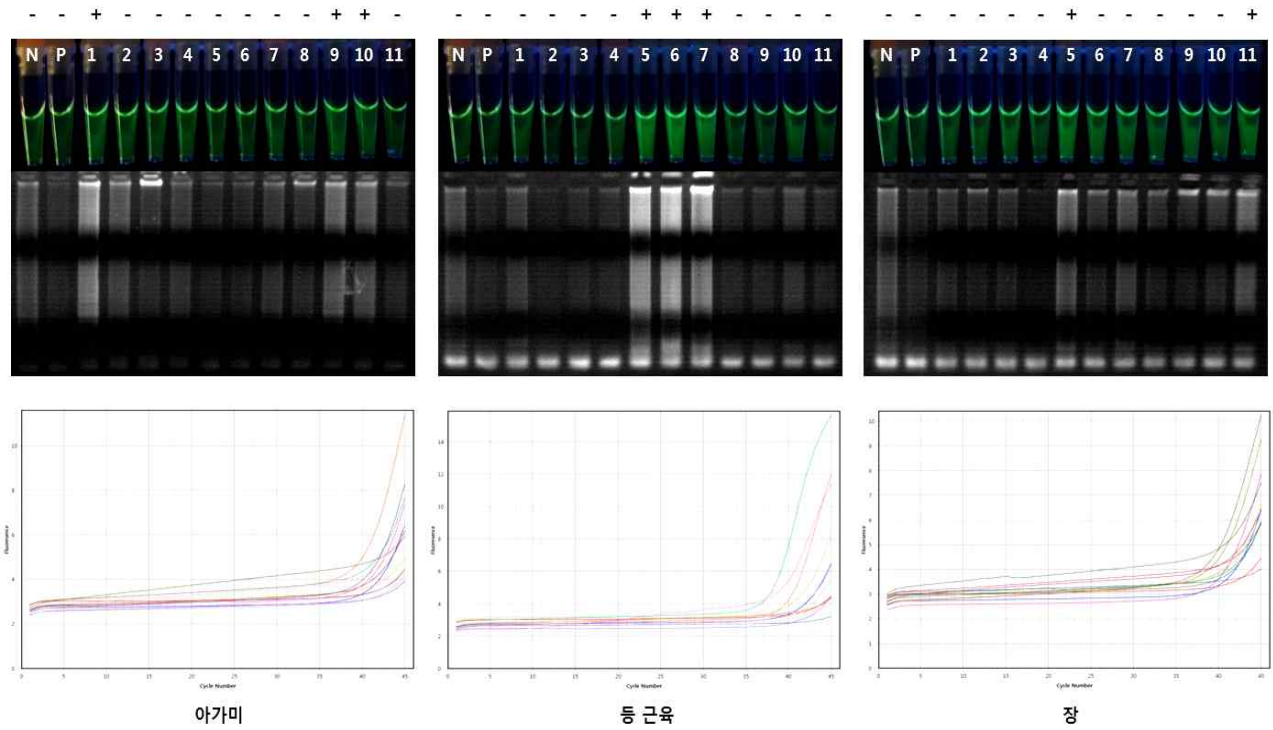


그림 17. 2016년 10월 양식 어류 VNNV 분석 결과

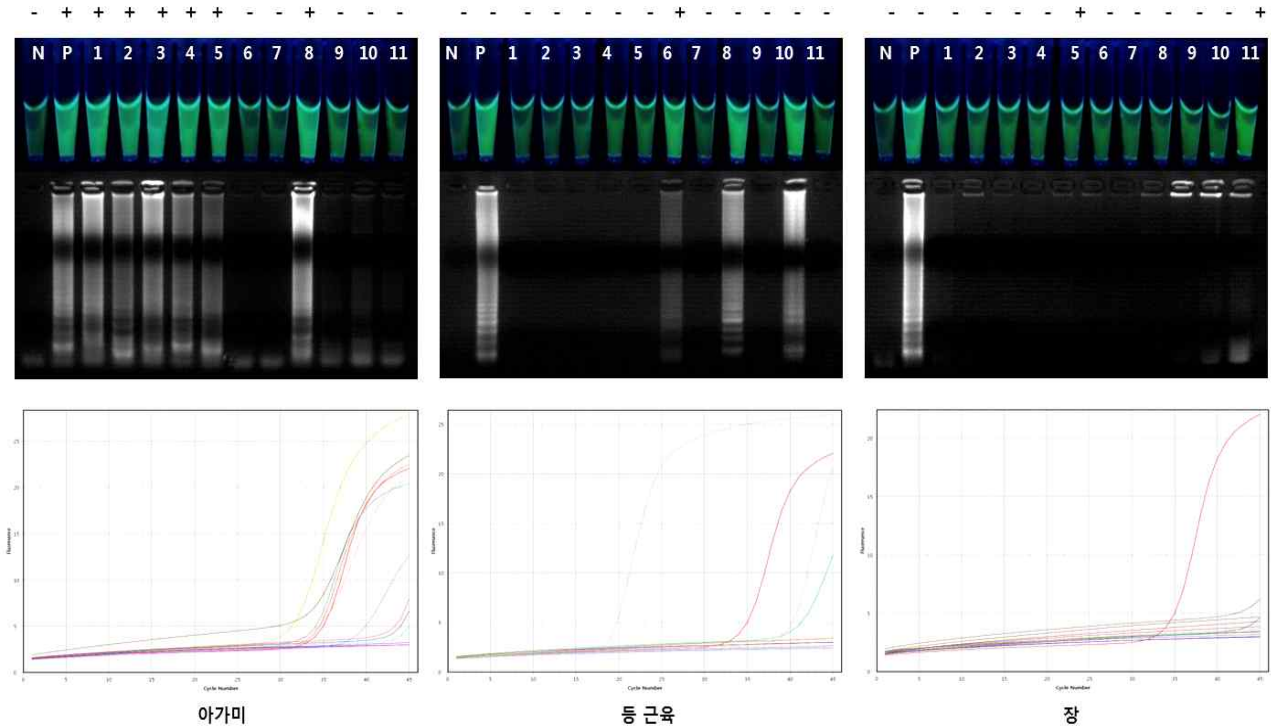


그림 18. 2016년 10월 양식 어류 MABV 분석 결과

- 10월 RSIV 진단 결과 아가미와 장에서 높은 감염률을 보였고, 등 근육에도 감염되어있기는 했으나 비교적 낮은 감염률이었음.
- 10월 VNNV 진단 결과 각 조직에서 비슷한 감염률을 보임.
- 10월 MABV 진단 결과 아가미의 감염률이 등 근육의 6배, 장의 3배로 다른 조직에 비해 월등히 높은 감염률을 보였음.
- 10월 양식어류 진단 결과 3종의 해양 병원성 바이러스 중 MABV가 가장 많이 검출되었고 그 다음으로 VNNV, RSIV 순으로 검출되었음.
- 어종별로 비교해보면 참돔에 가장 많은 바이러스가 감염되어 있었고 성어보다 치어의 감염률이 높았음. 조피볼락과 감성돔의 감염률은 거의 비슷했음.
- 8월, 10월 상관없이 MABV가 가장 많이 감염되어 있었음.
- 10월 VNNV 진단 결과 형광 시그널이 늦게 올라가고 no template control과 positive control간의 Cq값 차이가 거의 없는 것으로 보아 VNNV의 진단 효율 재분석이 필요함.
- 현장 시료를 이용한 반복 실험에서 RSIV와 MABV의 Real-time LAMP PCR 현장적용 가능성을 확인하였음.

## 제 2 절 scFv 기반 해양바이러스 진단키트 시제품 제작

### 1. 선발된 phage display scFv를 이용한 진단키트 시제품 제작

- 해양병원체 연구사업을 통해 선발된 바이러스에 특이적으로 결합하는 Phage display scFv를 이용하여 ELSIA kit 제작을 위한 확인 실험을 수행하였음.
- ELISA kit 프로토콜 확립을 위해 RSIV 특이 phage 중에서는 D2 phage를, NNV 특이 phage 중에서는 G7 phage를 이용하여 ELISA 조건 탐색을 수행하였음.

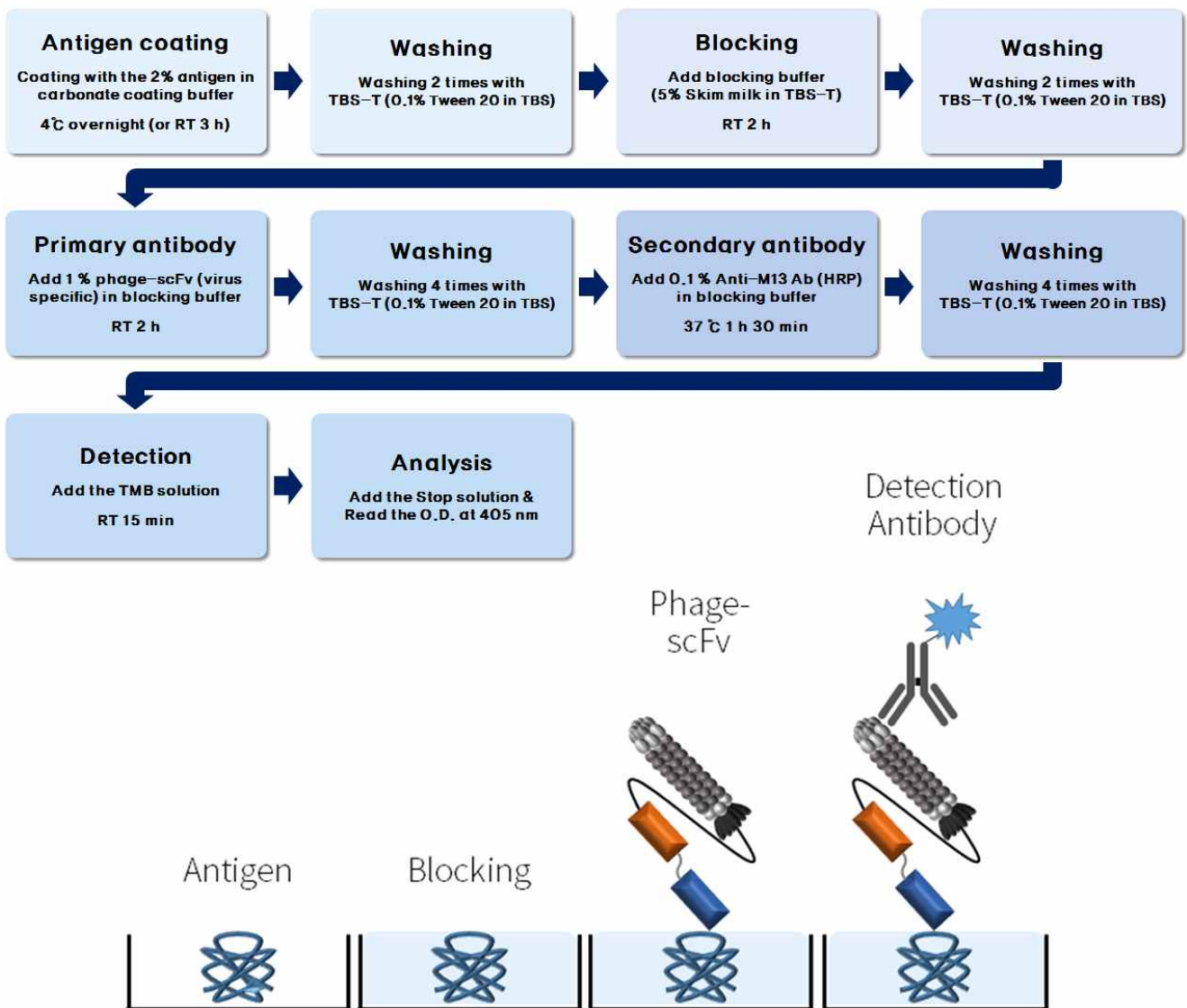


그림 19. Phage scFv를 이용한 Antigen ELISA 모식도

## 2. scFv ELISA 진단키트 시제품 2종

1. scFv ELISA kit  
Nervous necrosis virus (NNV)



2. scFv ELISA kit  
Red seabream iridovirus (RSIV)



그림 20. 제작된 scFv ELISA 진단키트 시제품 2종

- 실험을 통해 확립된 phage display scFv를 이용한 ELISA kit 실험 프로토콜은 아래와 같음
- 어류 조직을 액체질소로 얼려 멸균된 막자와 막자사발을 이용하여 균질화함.
- 균질화한 sample로부터 PRO-PREP™ Protein Extraction Solution(iNtRON)을 이용하여 단백질을 얻어냄.
- 얻어낸 단백질은 carbonate coating buffer에 50:1 비율로 희석하여 96-well immunoplate에 100  $\mu$ l 씩 넣어주고 4°C에서 overnight 반응.
- 플레이트의 용액을 버린 후 PBS/Tween-20(0.1%) 로 각 플레이트를 2회 washing함.
- 5% Skim milk/PBST 200  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 blocking
- 플레이트의 용액을 버린 후 PBS/Tween-20(0.1%) 로 각 플레이트를 2회 washing함.
- 선발한 Phage display scFv를 각 well 당 100  $\mu$ l 씩 첨가시켜 준 후 37°C에서 2시간 동안 반응시킴.
- PBS/Tween-20(0.1%) 로 각 플레이트를 4회 washing함.
- Anti-M13 antibody(HRP conjugate)를 5% Skim milk/PBST 용액에 1:1000으로 희석한 뒤 각 well 당 100  $\mu$ l 씩 첨가 시켜 준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시킴.
- PBS/Tween-20(0.1%)로 각 플레이트를 4회 washing함.
- HRP 의 기질 용액인 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 100  $\mu$ l 첨가 시켜 발색을 확인함.
- 흡광도 405 nm에서 확인하여 negative control과 비교 분석

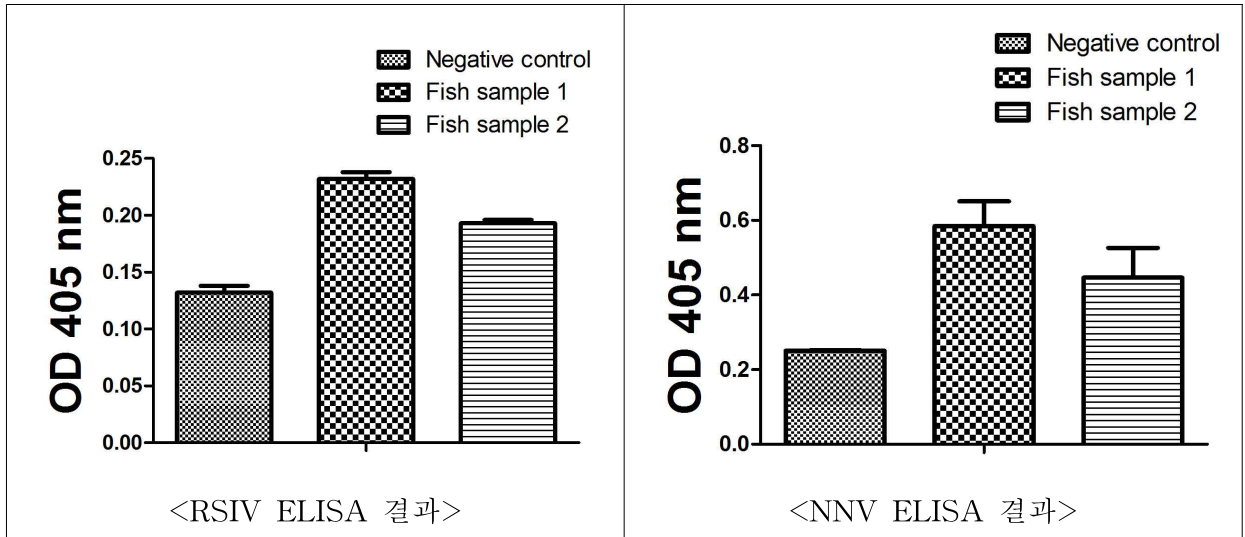


그림 21. ELISA 결과

### 3. 바이러스 특이 Phage display scFv kit를 이용한 바이러스 진단

- 제작된 Phage display scFv kit의 현장적용 가능성을 확인해보기 위해 바이러스 감염이 의심되는 양식장 어류 시료로부터 바이러스 진단 실험을 수행하고자 하였음.
- 바이러스 감염이 의심되는 조피볼락 6마리, 볼락 3마리, 쥐치 2마리 각각의 머리, 등 근육, 장 조직으로부터 실험을 진행함.

조피볼락

조피볼락 1	조피볼락 2	조피볼락 3	조피볼락 4	조피볼락 5	조피볼락 6
머리, 등 근육, 장	머리, 등 근육	머리, 장	등 근육, 장	등 근육, 장	등 근육, 장

볼락

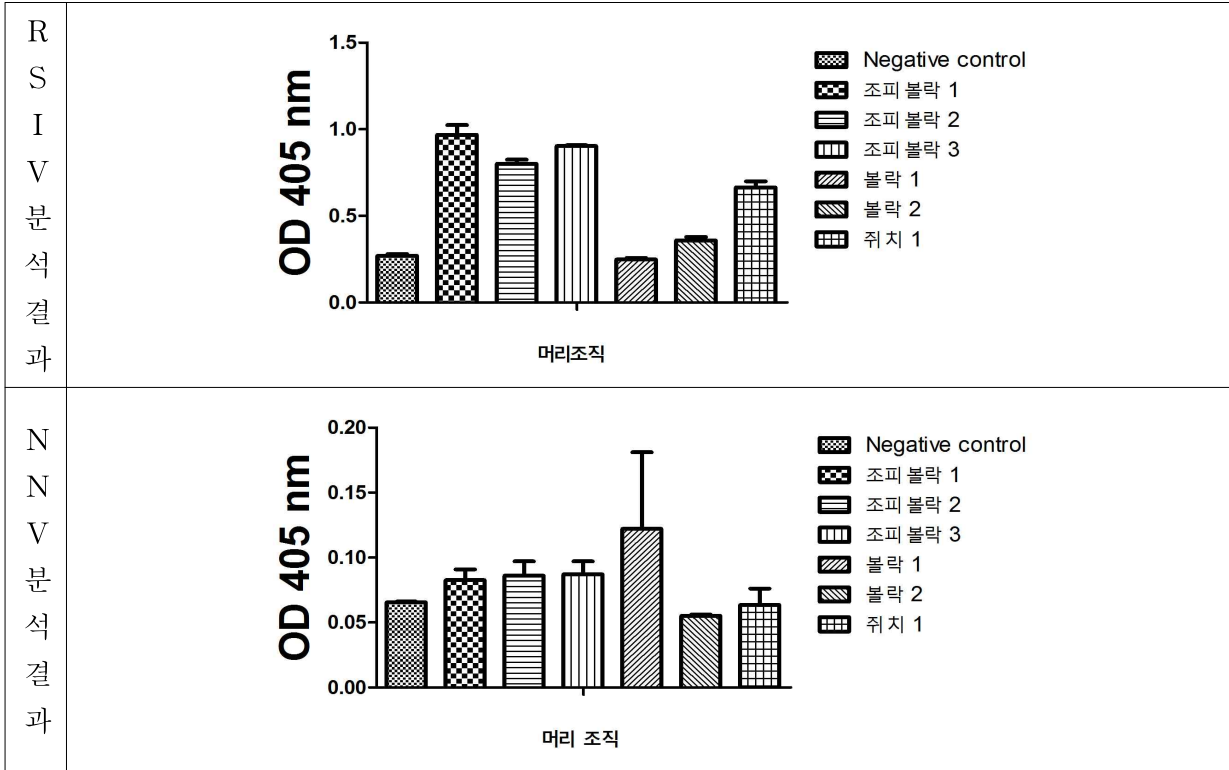
볼락 1	볼락 2	볼락 3
머리, 등 근육, 장	머리, 장	등 근육, 장

쥐치

쥐치 1	쥐치 2
머리, 등 근육, 장	등 근육, 장

표 8. 실험에 사용된 어종과 조직

- 각각의 시료에 대하여 ELISA 실험을 진행 한 후 부위별로 나누어 분석함.



[머리 조직 진단 결과]

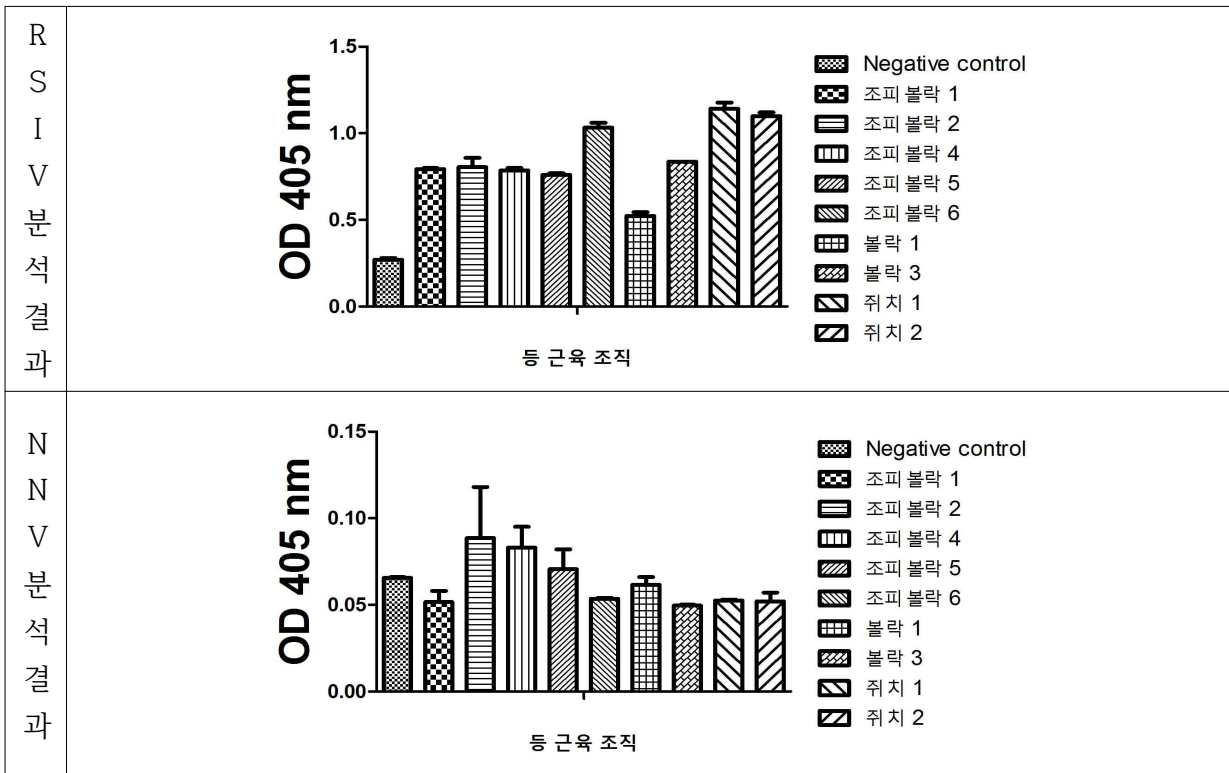


그림 22. 등 근육 조직 진단 결과

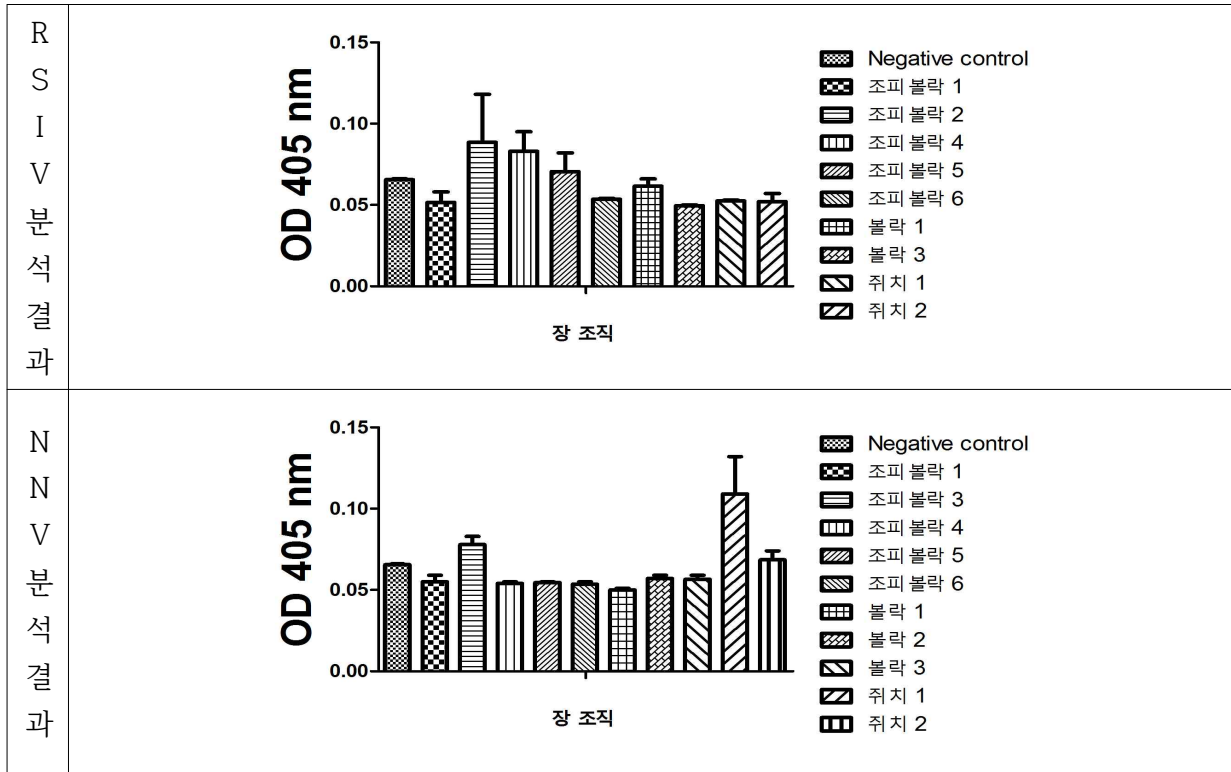


그림 23. 장 조직 진단 결과

- RSIV 진단 결과 등 근육 조직에서 가장 많은 바이러스가 검출되었고 장 조직에서 가장 적은 바이러스가 검출됨.
- 진단 부위 별로 차이는 있지만 불락 2를 제외한 모든 개체가 RSIV에 감염된 것으로 보임.
- NNV 진단 결과 불락 1의 머리 조직, 쥐치 1의 장 조직에서 바이러스가 검출 된 것으로 보이나, 전반적으로 실험 결과 NNV 진단 효율이 떨어진 것을 확인하였음.
- 현장 시료를 이용한 Phage display scFv kit의 현장적용 가능성 확인결과, RSIV 진단 키트는 실제 감염 의심 시료에서 감염 여부를 확인하는데 이용하는 것이 문제가 없을 것으로 판단됨.
- NNV의 경우, 실제 시료에서 신경 조직이 아닌 타 조직에 감염될 가능성이 낮고 전반적인 감염율이 낮은 것으로 알려져 있어, 다른 진단법을 통해 감염이 확인된 타 시료를 확보해 추가실험을 수행해야할 것으로 보임.

# 제 3 장 연구개발 성과의 우수성

## 제 1 절 기술의 완성도(성능목표 달성도)

성과지표	구체적 내용	목표	평가(검증)방법
기술스펙 (구체적 물성)*	관련기술 목표 SPEC(정량성과)		
	진단키트 시작품 성능 평가	현장적용	현장시료 검증
	진단키트 시작품 개선 및 성능 평가	현장적용	현장시료 검증
	진단키트의 최저 검출한도 제시	< 1x10 <sup>5</sup> copies	copy 수 비교
	진단키트의 비특이적 반응 제거	형광시약변경	검출조건확립
진단키트를 이용한 검사 시간 단축	3시간 이내	실시간 검증	
기술이전(건)*	(수요기업, 2017년 하반기)		
기술료수입(백만원)*	선급기술료: 80백만원, 경상기술료: 총 매출의 5%		
특허(건)	신규특허출원 (2건)		
기업성과	수요기업 기술이전 시 달성가능 성과 (매출액 등)		
시제품제작(건)	해양바이러스 6건		
기술개발/개량(건)	해양바이러스 2건		

## 제 2 절 연구결과의 우수성/혁신성/차별성

### 1. SYTO-9을 이용한 Real-time LAMP PCR 검출방법

- LAMP PCR은 실험 진행을 위한 온도 설정 단계가 3단계 이상 필요한 기존의 PCR 법과는 다르게 등온에서 모든 실험이 진행된다는 장점을 가지고 있음.
- 해양바이러스와 밀접하게 관련 있는 양식장과 같은 곳에서의 현장적용성을 높이기 위해 LAMP PCR법을 이전 과제에서 확립함.
- 하지만, 이전 실험에서 사용된 SYBR이 Real-time PCR과정을 방해하여 검출 특이성 및 민감도에 영향을 끼칠 가능성이 있기 때문에 기존 검출방법을 개선함.
- 본 연구사업에서 제작한 진단키트 시작품은 SYBR의 단점을 보완하고 실시간 모니터링이 가능한 SYTO-9을 이용하여 Real-time LAMP PCR법을 적용함.

### 2. scFv 기반 항체 대량 생산 및 항원-항체 반응조건 최적화

- RSIV 및 NNV 특이적인 scFv 항체 유전자 형질전환 및 대량생산 조건 확립을 통해 제품생산을 위한 항체를 안정적으로 공급할 수 있는 여건을 마련함.
- 항체 활성화 및 발색화 기법 최적화를 통해 검출 결과를 쉽게 판단할 수 있도록 함.



# 제 4 장 활용가능성 및 파급효과

## 1. 연구결과의 활용성 및 실용성

- 정책적, 산업적 활용방안
  - 정부차원에서 해양병원체 저감 정책 수립에 활용
  - 해양바이오산업 중 해양병원체 진단시장 선점
  
- 학문적 활용방안
  - 해양병원체의 지속적인 모니터링에 활용
  - 진단키트를 활용한 해양병원체 종합적 정보 관리

## 2. 해당 기술의 기술적 파급효과 및 기대효과

- 기술적 파급효과
  - 사용법이 복잡한 고가의 실험장비 대체효과
  - 진단키트 소형화를 통해 현장적용성 증진
  
- 기대효과
  - 기술이전 이후 진단키트 제품 출시
  - 안정적인 진단키트 공급을 위한 대량생산 기반 마련

## 3. 연구결과에 대한 기업 만족도 및 사업화 계획

- 진단키트 시작품 성능 확인
  - 수요기업에서 진단키트 시작품을 이용한 해양바이러스 검출실험 진행 중
    - (주)서린바이오사이언스 부설 서린생명과학연구소에서 추가 검증
    - 2017년 사업화 계획 논의 중

# 제 5 장 부 록

## 1. 논문게재 성과

게재일	논문명	저 자			학술지명	Vol. (No.)	국가명	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2016.12	Metagenomic characterization of viral communities in Goseong Bay, Korea	황진익	이택건	박소윤, 박미례, 이석찬, 조연화, 조원경, 이택건	Ocean Sci J	51(4):599-612	대한민국	SCIE
2017.01	Seasonal dynamics and metagenomic characterization of marine viruses in Goseong Bay, Korea	황진익	이택건	박소윤, 박미례, 이석찬, 이택건	Plos One	12(1): e169841	미국	SCI

## 2. 특허성과

특허의 경우				
특허명	발명자	출원일	출원번호	출원국가
신경괴사바이러스에 대한 항체 및 그의 용도	이택건, 이석찬, 박소윤, 황진익, 박미례, 길의준, 조상호, 서하늘, 박동훈	2016.10.10	10-2016-0130545	대한민국
적색 도미 이리도바이러스에 대한 항체 및 그의 용도	이택건, 이석찬, 박소윤, 황진익, 박미례, 길의준, 조상호, 서하늘, 박동훈	2016.10.17	10-2016-0134630	대한민국

## 3. 해양바이러스 검출키트 시작품 프로토콜

## Real-time LAMP PCR kit *Marine Birnavirus (MABV)*

### Ordering information

Components provided	volume (100 reaction)
Positive control	50 µl
gDNA Wipeout Buffer, x7	200 µl
Reverse Transcriptase (Reverse-transcription master mix)	100 µl
RT Buffer, x5	400 µl
RT Primer Mix	100 µl
BST polymerase	100 µl
BST Buffer, x10	250 µl
MABV LAMP primer Mix	400 µl
10mM dNTP	350 µl
0.5mM SYTO-9	20 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	250 µl
RNase-free water	1.9 ml x2
Sterile D.W	1.9 ml x2

Store at -20 °C

### Notes before starting

- Dissolve any precipitates in gDNA Wipeout Buffer by vortexing. If necessary, briefly incubate at 37 °C until the precipitates dissolve.
- RNase inhibitor and dNTPs are already included in the kit components. Do not add additional RNase inhibitor or dNTPs.
- Separate denaturation and annealing steps are not necessary before starting the reverse-transcription reaction.
- After reverse transcription, the reaction must be inactivated by incubation at 95 °C for 3min.
- BST Polymerase does not exhibit 3'→5' exonuclease activity.
- BST polymerase cannot be used for thermal cycle sequencing or PCR.
- Approximate fluorescence excitation/emission maxima :  
Excitation : 485nm, Emission : 498nm

### Protocol

1. Thaw template RNA on ice. Thaw gDNA Wipeout Buffer, Reverse Transcriptase, RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-free water at room temperature. Mix each solution by flicking the tubes. Centrifuge briefly to collect residual liquid from the sides of the tubes, and then keep on ice.
2. Prepare the genomic DNA elimination reaction on ice according to table 1.

**Table 1. gDNA elimination reaction components**

Components	volume /reaction
gDNA Wipeout Buffer, x7	2 µl
Template RNA, up to 1 µg*	variable
RNase-free water	variable
<b>Total reaction volume</b>	<b>14 µl</b>

\*This amount corresponds to the entire amount of RNA present, including any rRNA, mRNA, viral RNA, and carrier RNA present, and regardless of the primer used or cDNA analysed.

3. Incubate for 2min at 42 °C, then place immediately on ice.  
Note : Do not incubate at 42 °C for longer than 10min.
4. Prepare the Reverse Transcriptase on ice according to Table 2. Mix and then keep on ice. The reverse-transcription master mix contains all components required for first-strand cDNA synthesis except template RNA.  
Note : If using >1µg RNA, scale up the reaction linearly

**Table 2. Reverse-transcription reaction components**

Components	volume /reaction
Reverse Transcriptase* (Reverse-transcription master mix)	1 µl
RT Buffer, x5 <sup>†‡</sup>	4 µl
RT Primer Mix <sup>‡</sup>	1 µl
Template RNA entire genomic DNA elimination reaction (step 3)	14 µl (added at step 5)
<b>Total reaction volume</b>	<b>20 µl</b>

\*Also contains RNase inhibitor.

<sup>†</sup>Includes Mg<sup>2+</sup> and dNTPs.

‡ For convenience, premix RT Primer Mix and 5x RT Buffer in a 1:4 ratio if RT Primer Mix will be used routinely for reverse transcription. This premix is stable when stored at -20°C. Use 5 µl of the premix per 20ul reaction.

5. Add template RNA from step 3 (14 µl) to each tube containing reverse transcription master mix, Mix and then store on ice
6. Incubate for 15 min at 42°C.
7. Incubate for 3 min at 95°C to inactivate Reverse Transcriptase.
8. Prepare Real-time LAMP reaction on ice according To table 3.

**Table 3. Real-time LAMP reaction components**

Components	volume /reaction
BST polymerase	1 µl
BST Buffer, x10	2.5 µl
MABV LAMP primer Mix	4 µl
10mM dNTP	3.5 µl
0.5mM SYTO-9	0.2 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	2.5 µl
Template (cDNA or positive control)	2 µl
Sterile D.W	Up to 25 µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25 ul</b>

\*final concentration is 1.6 µM of FIP/BIP and 0.4 µM of F3/B3

9. Transfer 25 ul of the complete Real-time LAMP reaction mix into each PCR tubes or well plate
10. Cap the tubes or seal the plate with the appropriate cover. Centrifuge briefly.
11. Load the tubes or plate into the instrument than run according to Table 4.

**Table 4. Cycling instruction**

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	step
63°C	1min	1	BST polymerase activation
63°C	80sec	45	fluorescence Excitation : 485nm Emission:498nm
63°C	45sec	1	
80°C	5min	optional	BST polymerase inactivation

#### Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeouLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : [slbi@seoulin.co.kr](mailto:slbi@seoulin.co.kr)  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## Real-time LAMP PCR kit *Nervous necrosis virus (NNV)*

### Ordering information

Components provided	volume (100 reaction)
Positive control	50 µl
gDNA Wipeout Buffer, x7	200 µl
Reverse Transcriptase (Reverse-transcription master mix)	100 µl
RT Buffer, x5	400 µl
RT Primer Mix	100 µl
BST polymerase	100 µl
BST Buffer, x10	250 µl
NNV LAMP primer Mix	400 µl
10mM dNTP	350 µl
0.5mM SYTO-9	20 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	250 µl
RNase-free water	1.9 ml x2
Sterile D.W	1.9 ml x2

Store at -20 °C

### Notes before starting

- Dissolve any precipitates in gDNA Wipeout Buffer by vortexing. If necessary, briefly incubate at 37 °C until the precipitates dissolve.
- RNase inhibitor and dNTPs are already included in the kit components. Do not add additional RNase inhibitor or dNTPs.
- Separate denaturation and annealing steps are not necessary before starting the reverse-transcription reaction.
- After reverse transcription, the reaction must be inactivated by incubation at 95 °C for 3min.
- BST Polymerase does not exhibit 3'→5' exonuclease activity.
- BST polymerase cannot be used for thermal cycle sequencing or PCR
- Approximate fluorescence excitation/emission maxima :  
Excitation : 485nm, Emission : 498nm

### Protocol

1. Thaw template RNA on ice. Thaw gDNA Wipeout Buffer, Reverse Transcriptase, RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-free water at room temperature. Mix each solution by flicking the tubes. Centrifuge briefly to collect residual liquid from the sides of the tubes, and then keep on ice.
2. Prepare the genomic DNA elimination reaction on ice according to table 1.

**Table 1. gDNA elimination reaction components**

Components	volume /reaction
gDNA Wipeout Buffer, x7	2 µl
Template RNA, up to 1 µg*	variable
RNase-free water	variable
<b>Total reaction volume</b>	<b>14 µl</b>

\*This amount corresponds to the entire amount of RNA present, including any rRNA, mRNA, viral RNA, and carrier RNA present, and regardless of the primer used or cDNA analysed.

3. Incubate for 2min at 42 °C, then place immediately on ice.  
Note : Do not incubate at 42 °C for longer than 10min.
4. Prepare the Reverse Transcriptase on ice according to Table 2. Mix and then keep on ice. The reverse-transcription master mix contains all components required for first-strand cDNA synthesis except template RNA.  
Note : If using >1µg RNA, scale up the reaction linearly

**Table 2. Reverse-transcription reaction components**

Components	volume /reaction
Reverse Transcriptase* (Reverse-transcription master mix)	1 µl
RT Buffer, x5 <sup>†</sup>	4 µl
RT Primer Mix <sup>†</sup>	1 µl
Template RNA entire genomic DNA elimination reaction (step 3)	14 µl (added at step 5)
<b>Total reaction volume</b>	<b>20 µl</b>

\*Also contains RNase inhibitor.

<sup>†</sup>Includes Mg<sup>2+</sup> and dNTPs.

‡ For convenience, premix RT Primer Mix and 5x RT Buffer in a 1:4 ratio if RT Primer Mix will be used routinely for reverse transcription. This premix is stable when stored at -20°C. Use 5 µl of the premix per 20ul reaction.

5. Add template RNA from step 3 (14 µl) to each tube containing reverse transcription master mix, Mix and then store on ice
6. Incubate for 15 min at 42°C.
7. Incubate for 3 min at 95°C to inactivate Reverse Transcriptase.
8. Prepare Real-time LAMP reaction on ice according To table 3.

**Table 3. Real-time LAMP reaction components**

Components	volume /reaction
BST polymerase	1 µl
BST Buffer, x10	2.5 µl
NNV LAMP primer Mix*	5 µl
10mM dNTP	3.5 µl
0.5mM SYTO-9	0.2 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	2.5 µl
Template (cDNA or positive control)	2 µl
Sterile D.W	Up to 25 µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25 ul</b>

\*final concentration is 1.6 µM of FIP/BIP and 0.4 µM of F3/B3

9. Transfer 25 ul of the complete Real-time LAMP reaction mix into each PCR tubes or well plate
10. Cap the tubes or seal the plate with the appropriate cover. Centrifuge briefly.
11. Load the tubes or plate into the instrument than run according to Table 4.

**Table 4. Cycling instruction**

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	step
63°C	1min	1	BST polymerase activation
63°C	80sec	45	fluorescence Excitation : 485nm Emission:498nm
63°C	45sec	1	
80°C	5min	optional	BST polymerase inactivation

#### Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeouLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : [slbi@seoulin.co.kr](mailto:slbi@seoulin.co.kr)  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## Real-time LAMP PCR kit *Red seabream iridovirus(RSIV)*

### Ordering information

Components provided	volume (100 reaction)
Positive control	50 µl
BST polymerase	100 µl
BST Buffer, x10	250 µl
RSIV LAMP primer Mix	500 µl
10mM dNTP	350 µl
0.5mM SYTO-9	20 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	250 µl
RNase-free water	1.9 ml x2
Sterile D.W	1.9 ml x2

Store at -20°C

### Notes before starting

- BST Polymerase does not exhibit 3'→5' exonuclease activity.
- BST polymerase cannot be used for thermal cycle sequencing or PCR
- Approximate fluorescence excitation/emission maxima :  
Excitation : 485nm, Emission : 498nm

### Protocol

1. Add template RNA from step 3 (14 µl) to each tube containing reverse transcription master mix, Mix and then store on ice
2. Incubate for 15 min at 42°C.
3. Incubate for 3 min at 95°C to inactivate Reverse Transcriptase.
4. Prepare Real-time LAMP reaction on ice according To table 3.

**Table 1. Real-time LAMP reaction components**

Components	volume /reaction
BST polymerase	1 µl
BST Buffer, x10	2.5 µl
RSIV LAMP primer Mix*	5 µl
10mM dNTP	3.5 µl
0.5mM SYTO-9	0.2 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	2.5 µl
Template (cDNA or positive control)	2 µl
Sterile D.W	Up to 25 µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25 ul</b>

\*final concentration is 1.6 µM of FIP/BIP and 0.4 µM of F3/B3

5. Transfer 25 ul of the complete Real-time LAMP reaction mix into each PCR tubes or well plate
6. Cap the tubes or seal the plate with the appropriate cover. Centrifuge briefly.
7. Load the tubes or plate into the instrument than run according to Table 4.

**Table 2. Cycling instruction**

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	
63°C	1min	1	BST polymerase activation
63°C	80sec	45	fluorescence Excitation : 485nm Emission:498nm
63°C	45sec	1	
80°C	5min	optional	BST polymerase inactivation

### Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeoulLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : slbi@seoulin.co.kr  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## Real-time LAMP PCR kit

### *Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)*

#### Ordering information

Components provided	volume (100 reaction)
Positive control	50 µl
gDNA Wipeout Buffer, x7	200 µl
Reverse Transcriptase (Reverse-transcription master mix)	100 µl
RT Buffer, x5	400 µl
RT Primer Mix	100 µl
BST polymerase	100 µl
BST Buffer, x10	250 µl
VHSV LAMP primer Mix	400 µl
10mM dNTP	350 µl
0.5mM SYTO-9	20 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	250 µl
RNase-free water	1.9 ml x2
Sterile D.W	1.9 ml x2

Store at -20 °C

#### Notes before starting

- Dissolve any precipitates in gDNA Wipeout Buffer by vortexing. If necessary, briefly incubate at 37 °C until the precipitates dissolve.
- RNase inhibitor and dNTPs are already included in the kit components. Do not add additional RNase inhibitor or dNTPs.
- Separate denaturation and annealing steps are not necessary before starting the reverse-transcription reaction.
- After reverse transcription, the reaction must be inactivated by incubation at 95 °C for 3min.
- BST Polymerase does not exhibit 3' → 5' exonuclease activity.
- BST polymerase cannot be used for thermal cycle sequencing or PCR.
- Approximate fluorescence excitation/emission maxima :  
Excitation : 485nm, Emission : 498nm

#### Protocol

1. Thaw template RNA on ice. Thaw gDNA Wipeout Buffer, Reverse Transcriptase, RT Buffer, RT Primer Mix, and RNase-free water at room temperature. Mix each solution by flicking the tubes. Centrifuge briefly to collect residual liquid from the sides of the tubes, and then keep on ice.
2. Prepare the genomic DNA elimination reaction on ice according to table 1.

**Table 1. gDNA elimination reaction components**

Components	volume /reaction
gDNA Wipeout Buffer, x7	2 µl
Template RNA, up to 1 µg*	variable
RNase-free water	variable
<b>Total reaction volume</b>	<b>14 µl</b>

\*This amount corresponds to the entire amount of RNA present, including any rRNA, mRNA, viral RNA, and carrier RNA present, and regardless of the primer used or cDNA analysed.

3. Incubate for 2min at 42 °C, then place immediately on ice.  
Note : Do not incubate at 42 °C for longer than 10min.
4. Prepare the Reverse Transcriptase on ice according to Table 2. Mix and then keep on ice. The reverse-transcription master mix contains all components required for first-strand cDNA synthesis except template RNA.  
Note : If using >1µg RNA, scale up the reaction linearly

**Table 2. Reverse-transcription reaction components**

Components	volume /reaction
Reverse Transcriptase* (Reverse-transcription master mix)	1 µl
RT Buffer, x5 <sup>††</sup>	4 µl
RT Primer Mix <sup>†</sup>	1 µl
Template RNA entire genomic DNA elimination reaction (step 3)	14 µl (added at step 5)
<b>Total reaction volume</b>	<b>20 µl</b>

\*Also contains RNase inhibitor.

<sup>†</sup>Includes Mg<sup>2+</sup> and dNTPs.



‡ For convenience, premix RT Primer Mix and 5x RT Buffer in a 1:4 ratio if RT Primer Mix will be used routinely for reverse transcription. This premix is stable when stored at -20°C. Use 5 µl of the premix per 20ul reaction.

5. Add template RNA from step 3 (14 µl) to each tube containing reverse transcription master mix, Mix and then store on ice
6. Incubate for 15 min at 42 °C.
7. Incubate for 3 min at 95 °C to inactivate Reverse Transcriptase.
8. Prepare Real-time LAMP reaction on ice according to table 3.

**Table 3. Real-time LAMP reaction components**

Components	volume /reaction
BST polymerase	1 µl
BST Buffer, x10	2.5 µl
VHSV LAMP primer Mix*	4 µl
10mM dNTP	3.5 µl
0.5mM SYTO-9	0.2 µl
PCR Enhancer, x10 (optional)	2.5 µl
Template (cDNA or positive control)	2 µl
Sterile D.W	Up to 25 µl
<b>Total reaction volume</b>	<b>25 ul</b>

\*final concentration is 1.6 µM of FIP/BIP and 0.4 µM of F3/B3

9. Transfer 25 ul of the complete Real-time LAMP reaction mix into each PCR tubes or well plate
10. Cap the tubes or seal the plate with the appropriate cover. Centrifuge briefly.
11. Load the tubes or plate into the instrument than run according to Table 4.

**Table 4. Cycling instruction**

Real-time LAMP PCR condition			
Temp.	time	Cycles	step
63 °C	1min	1	BST polymerase activation
63 °C	80sec	45	fluorescence Excitation : 485nm Emission:498nm
63 °C	45sec	1	
80 °C	5min	optional	BST polymerase inactivation

**Technical Support**

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeouLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : slbi@seoulin.co.kr  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## scFv ELISA kit Protocol

### *Nervous necrosis virus (NNV)*

#### Ordering information

Components provided	volume (96 reaction)
Carbonate coating buffer	20 ml
Washing Buffer	350ml
Blocking buffer	65ml
scFv-displayed phage	100 µl
Anti-M13 antibody (HRP)	20 µl
TMB	15 ml
Stop solution	10 ml
96well Immuno plate	1 ea

Store at 4°C

#### Protocol

- (1) Coat the wells of 96-well plate (SPL 96well Immuno Plate) with the 2% protein extracted from fish in carbonate coating buffer (pH 9.6). After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 3h at RT (or 4°C overnight).
- (2) Remove the coating solution and wash the plate twice by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS\*). The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- (3) Block the wells by adding 100 ul blocking buffer (5% skim-milk/TBS-T). After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- (4) Wash the plate twice with 100 ul TBS-T. The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- (5) Add 100 ul of RSIV specific scFv-expressing phage diluted 1:100 in blocking buffer. After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- (6) Remove the solution and wash the plate four times by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS). The solutions or washes are

removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.

- (7) Add 100 ul of Anti-M13 antibody (HRP) (sino biological) diluted 1:1000 in blocking buffer to each well. After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- (8) Remove the solution and wash the plate four times by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS). The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- (9) Add the 100ul of TMB solution to each well. Gently mix and then protect from light to incubate for 15min at room temperature.
- (10) Add the 50ul of stop solution (650 nm stop solution for TMB substrate) to each well.
- (11) Read the optical density (O.D.) at 650 nm using a microtiter plate reader.

#### Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeouLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : [slbi@seoulin.co.kr](mailto:slbi@seoulin.co.kr)  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## scFv ELISA kit Protocol *Red seabream iridovirus(RSIV)*

### Ordering information

Components provided	volume (96 reaction)
Carbonate coating buffer	20 ml
Washing Buffer	350ml
Blocking buffer	65ml
scFv-displayed phage	100 µl
Anti-M13 antibody (HRP)	20 µl
TMB	15 ml
Stop solution	10 ml
96well Immuno plate	1 ea

Store at 4°C

### Protocol

- Coat the wells of 96-well plate (SPL 96well Immuno Plate) with the 2% protein extracted from fish in carbonate coating buffer (pH 9.6). After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 3h at RT (or 4°C overnight).
- Remove the coating solution and wash the plate twice by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS\*). The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- Block the wells by adding 100 ul blocking buffer (5% skim-milk/TBS-T). After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- Wash the plate twice with 100 ul TBS-T. The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- Add 100 ul of RSIV specific scFv-expressing phage diluted 1:100 in blocking buffer. After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- Remove the solution and wash the plate four times by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1%

Tween-20 in TBS). The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.

- Add 100 ul of Anti-M13 antibody (HRP) (sino biological) diluted 1:1000 in blocking buffer to each well. After that, cover the plate with wet paper towel and incubate for 2 h at room temperature.
- Remove the solution and wash the plate four times by filling the wells with 100 ul TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS). The solutions or washes are removed and the remaining drops of wells are removed by patting the plate on a paper towel.
- Add the 100ul of TMB solution to each well. Gently mix and then protect from light to incubate for 15min at room temperature.
- Add the 50ul of stop solution (650 nm stop solution for TMB substrate) to each well.
- Read the optical density (O.D.) at 650 nm using a microtiter plate reader.

### Technical Support

If the troubleshooting guide does not solve the difficulty you are experiencing, please contact Technical Support with details of reaction setup, cycling conditions and relevant date.

SeouLin Bioscience Institute B1 #A, Korea Bio Park, 700, Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : [slbi@seoulin.co.kr](mailto:slbi@seoulin.co.kr)  
Website : [www.seoulin.co.kr](http://www.seoulin.co.kr)  
Tel. 82-31-628-3000  
Fax. 82-31-628-3100

## 주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.