(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월21일
(11) 등록번호 10-1559287
(24) 등록일자 2015년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0147934
(22) 출원일자 2013년11월29일
심사청구일자 2013년11월29일
(65) 공개번호 10-2015-0062851
(43) 공개일자 2015년06월08일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Virological Methods, 2004, Vol. 121, p. 155-161*
CN102559928 A*
CN103014181 A*
Journal of Virological Methods, 2013, Vol. 194, p. 211- 216 (Available online 8 September 2013)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이택견
경기도 안성시 중앙로 274-7 한빛마을우남퍼스트빌아파트 107동 301호
서승석
경상남도 거제시 장목면 장목4길 8
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
진천웅, 조현동, 정종옥

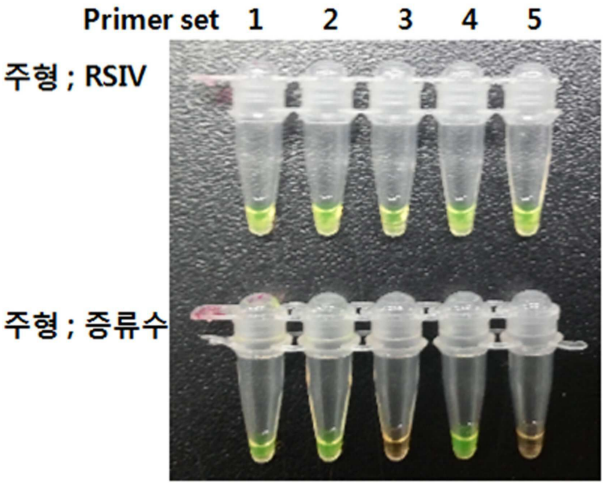
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 박정웅

(54) 발명의 명칭 **이리도바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물, 및 이를 이용한 검출방법**

(57) 요 약

본 발명은 이리도바이러스(iridovirus)를 검출하기 위한 프라이머에 대한 것으로, 특히 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)법을 이용하여 이리도바이러스를 검출하기 위한 것이며, 더욱 상세하게는 이리도바이러스에 감염되었는지의 여부를 현장에서 육안으로 신속하게 고감도로 확인할 수 있는 이리도바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물, 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

황진익

경상남도 거제시 중곡로2길 25 고려아파트 503동 1005호

박미례

경상남도 거제시 장목면 장목1길 41

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PE99154
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술원
연구사업명	한국해양과학기술원 연구 운영비 지원
연구과제명	남해생태계 이머징 해양병원체 탐색 및 검출기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	한국해양과학기술원
연구기간	2013.01.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 21의 outer-정방향 프라이머, 서열번호 22의 outer-역방향 프라이머, 서열번호 23의 inner-정방향 프라이머, 서열번호 24의 inner-역방향 프라이머로 이루어진 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이리도바이러스는 적색 도미 이리도바이러스(Red sea bream iridovirus : RSIV)인 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 4

제1항 또는 제3항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응버퍼를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 조성물.

청구항 6

시료에서 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 단계;

상기 게놈 DNA를 주형으로 제4항 또는 제5항에 따른 조성물을 이용하여 동온증폭법을 수행하여 표적서열을 증폭시키는 단계; 및

상기 증폭시킨 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 이리도바이러스 검출방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시료는 어류인 것을 특징으로 하는 이리도바이러스 검출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 어류는 참돔, 돌돔, 감성돔, 방어류, 부시림, 농어 및 전갱이류로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 이리도바이러스 검출방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 등온증폭법은 63℃ 내지 65℃에서 30분 내지 2시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 이리도바이러스 검출방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 증폭시킨 산물을 검출하는 단계는 전기영동(electrophoresis) 또는 SYBR Green I을 이용하여 증폭된 DNA를 확인하는 것을 특징으로 하는 이리도바이러스 검출방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이리도바이러스(iridovirus)를 검출하기 위한 프라이머에 대한 것으로, 특히 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)법을 이용하여 이리도바이러스를 검출하기 위한 것이며, 더욱 상세하게는 이리도바이러스에 감염되었는지의 여부를 현장에서 육안으로 신속하게 고감도로 확인할 수 있는 이리도바이러스를 검출하기 위한 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 이를 포함하는 프라이머 조성물, 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라의 대표적인 어류질병으로는 이리도바이러스병을 포함해서 에드와드병, 연쇄구균병, 비브리오병, 활주세균병 등이 있다. 이들 바이러스는 수산동물 질병으로 국내 총 피해규모가 연간 약 2,500억원으로 추정된다.

[0003] 특히, 이리도바이러스(iridovirus)는 1990년 일본에서 처음으로 발병한 이후, 한국 중국 동남아시아 국가들 에서 발병한 어류전염병으로 수평감염과 20~30℃의 고수온기에 발병한다. 감염된 어류는 무기력하게 유영하며 채색흑화/회색, 출혈, 안구돌출 등의 증상이 있으며, 해부 시 지장 종대/흑화, 위심강내 출혈 등이 특징적으로 나타난다.

[0004] 한편, 종래의 바이러스 진단법으로는 전자현미경 또는 혈청학적 방법을 주로 사용하였다. 그러나, 전자현미경을 이용한 방법은 바이러스의 존재를 확인할 수는 있지만 형태학적 특징으로 종을 진단하는 것은 거의 불가능하다. 또한, 혈청학적 방법 중 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법은 가장 일반적으로 사용되는 진단 방법이나 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 진단법보다 검출감도가 약 1,000배 정도 낮으며, 항체와 검사시료의 예상하지 못한 비특이적 반응으로 정확한 진단이 실패하는 경우가 자주 발생한다.

[0005] 최근에는 바이러스를 진단하기 위하여 높은 검출감도와 편리성을 가지고 있는 PCR 방법을 일반적으로 많이 사용하고 있으나, PCR을 이용한 진단 방법은 특이적인 프라이머(primer)의 개발이 매우 중요하며, 증폭된 반응산물을 전기영동(electrophoresis)으로 확인하고, 최종적으로는 염기서열 분석(DNA sequencing)을 해야 하는 일련의 과정을 거쳐야한다. 더불어 이러한 방법은 중합효소연쇄반응기(Thermocycler)와 같은 전문적인 장비 및 이를 운용할 수 있는 전문 인력이 요구되며, 최종 확인을 위한 증폭산물의 염기서열 분석은 고비용 및 고기술력을 요구하는 과정이다. 또한 이러한 일련의 과정들은 수행하는데 있어서 많은 시간이 소요되며 육안으로 식별 가능한 검출법이 아니기 때문에 분석 장비가 갖춰지지 않은 현장에서의 활용력은 현저히 떨어진다. 이와 같이 바이러스

를 단시간 내에 효과적으로 검출하기 위해서는, 전문장비 없이 현장에서 실시간으로 검출할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)은 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, 등온증폭법은 고정된 일정 온도에서 접합 및 신장이 가능한 장점을 가지고 있다. 이는 기존 PCR 방법에 사용되는 *Taq* DNA 중합효소(*Taq* DNA polymerase)를 사용하는 대신, 핵산말단 가수분해(exonuclease) 기능을 갖고 있는 *Bst* DNA 중합효소(*Bst* DNA polymerase)를 사용함으로써 열에 의존하지 않고 DNA의 이중나선 구조의 변성을 유발할 수 있기 때문이다. 따라서 등온증폭법은 유전자를 증폭하는 동안 온도의 변화를 필요로 하지 않기 때문에 전문장비 없이 손쉽게 고정된 온도에서 유전자 증폭을 가능하게 한다.

[0007] 그러나, LAMP법을 이용하여 바이러스와 관련된 특정 유전자의 검출이 가능하였다 하더라도 결과의 확인을 위해서는 전기영동기 등의 실험실적 장비와 기술을 필요로 한다. 따라서 실제로 LAMP를 이용한 검출법의 현장적용을 위해서는 검출단계에서 뿐만 아니라 결과의 확인 단계에서도 현장에서 시행할 수 있는 손쉬운 방법이 요구된다.

[0008] 본 발명자들은 어류 양식에서 크게 문제가 되고 있는 이리도바이러스(iridovirus)를 용이하게 검출하기 위해 연구한 결과, 현장에서 전문장비 없이 이리도바이러스를 모두 검출할 수 있는 등온증폭반응용 프라이머 세트를 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 이리도바이러스를 검출하거나 이리도바이러스 감염 엽부를 고감도이면서 신속하고 정확하게 확인할 수 있는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 감염 진단용 프라이머 세트 및/또는 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 이리도바이러스 감염여부 결과를 신속하면서도 고감도로 육안 확인이 가능하도록 한 이리도바이러스 검출방법을 제공하는데 다른 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 이리도바이러스 감염 여부의 진단을 용이하게 확인할 수 있는 진단용 키트를 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 21 내지 24의 염기서열을 가지는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스(iridovirus) 검출용 프라이머 세트이다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기한 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 조성물인 것도 가능하다.

[0014] 또한, 본 발명의 다른 실시형태는, 시료에서 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 단계; 상기 게놈 DNA를 주형으로 상기한 프라이머 조성물을 이용하여 동온증폭법을 수행하여 표적서열을 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭시킨 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 이리도바이러스 검출방법이다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 실시형태는, 상기한 프라이머 세트 및/또는 조성물을 포함하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스(iridovirus) 검출용 진단 키트일 수 있다.

[0016] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

발명의 효과

[0017] 상기한 본 발명에 따른 이리도바이러스 검출용 프라이머 세트는 이를 포함하는 진단용 키트에 시료를 넣고 LAMP

법으로 항온 증폭시킨 다음 발광물질인 SybrGreen을 넣고 녹색의 형광을 관찰함으로써, 전기영동 등의 복잡한 과정 없이 시료에 이리도바이러스가 포함되었는지 여부를 고감도이면서 신속하게 육안으로 확인할 수 있다는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 등온증폭반응용 프라이머 세트를 이용하여 이리도바이러스(RSIV)를 증폭시킨 증폭 산물의 전기영동 결과를 보여주는 도면이다.

도 2는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 등온증폭반응용 프라이머 세트를 이용하여 노다바이러스(Viral nervous necrosis virus (VNNV))를를 증폭시킨 증폭 산물의 전기영동 결과를 보여주는 도면이다.

도 3은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 유전자를 SYBR Green Ⅰ을 이용하여 자연광원 하에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시 예를 가질 수 있는 바, 특정 실시 예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에서 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0020] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0021] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.

[0022] 본 발명은 서열번호 21 내지 24의 염기서열을 가지는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스(iridovirus) 검출용 프라이머 세트이다.

[0023] 본 발명자들은 단시간 내에 전문장비 없이 Red sea bream iridovirus (RSIV)를 검출하기 위하여 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 이용하였다. 등온증폭법은 기존의 PCR(polymerase chain reaction)과 달리 유전자를 증폭하기 위한 온도조절을 필요로 하지 않기 때문에 전문장비 없이 유전자를 증폭할 수 있으며 단시간 내에 고농도의 유전자 증폭이 가능하다. 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 이용하기 위해서는 4개의 프라이머(F3, B3, FIP, 및 BIP)가 하나의 세트로 작용하여야 하는데, 이중 F3와 FIP는 유전자의 5'방향에 결합하는 프라이머이며, B3와 BIP는 3'방향에서 역방향으로 결합하는 프라이머이다. 또한 FIP와 BIP는 F2(혹은 B2)와 F1c(혹은 B1c)의 염기서열을 포함하도록 하는 프라이머이다.

[0024] 이와 같이 LAMP법을 위해서는 네 개의 프라이머가 필요하고, 구체적으로는 inner-정방향 프라이머, inner-역방향 프라이머, outer-정방향 프라이머 및 outer-역방향 프라이머를 필요로 한다. 본 발명에 따른 각각의 프라이머는 후술하는 표 3에 나타낸 바와 같으며, 구체적으로 상기 프라이머는 서열번호 21의 outer-정방향 프라이머, 서열번호 22의 outer-역방향 프라이머, 서열번호 23의 inner-정방향 프라이머, 서열번호 24의 inner-역방향 프라이머를 포함하여 이루어진 것이 바람직하다.

[0025] 본 발명자들은 등온증폭법을 이용하여 이리도바이러스를 검출할 수 있는 프라이머를 제작하기 위하여, 이리도바이러스의 전체 서열이 아닌 외피단백질(coat protein 또는 virion protein)의 서열을 주형으로 하였다. 외피단백질은 바이러스가 하나의 개체로 만들어지기 위해 반드시 필요한 단백질로서, 바이러스 종에 따라서는 어류 내에서 바이러스가 세포간의 이동을 할 때에도 관여한다고 알려져 있다. 즉, 외피단백질은 바이러스가 감염되었다

면 무조건 생성되는 단백질일 수 있고, 본 발명에서는 이를 주형으로 사용하여 프라이머를 제작한 것이 특징이다.

[0026] 또한, 본 발명의 프라이머는 이리도바이러스 유전자에서 변이가 극히 적은 부분을 바탕으로 디자인된 것이 특징이며, 이에 따라 실제 이리도바이러스에 감염되었는지 여부를 진단할 수 있을 뿐만 아니라, 이론적으로 합성된 이리도바이러스 유전자도 검출할 수 있다.

[0027] 상기 이리도바이러스는 특별히 제한되지는 않지만, 적색 도미 이리도바이러스(Red sea bream iridovirus : RSIV)인 것이 바람직하고, 이외에 이 기술분야에 알려진 다른 이리도바이러스를 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기한 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 LAMP법을 이용한 이리도바이러스 검출용 프라이머 조성물일 수 있고, 이러한 프라이머 조성물은 등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응버퍼를 더 포함하는 것이 가능하다.

[0029] 한편, 본 발명은 상기한 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용하여 LAMP 증폭시키는 단계를 포함하는 이리도바이러스 검출 또는 진단 방법일 수 있다. 상기에서 적용되는 LAMP법은 공지된 방법을 적용하면 용이하게 실시할 수 있다.

[0030] 구체적으로, 본 발명의 다른 실시형태는, 시료에서 게놈 DNA(gDNA)를 추출하는 단계; 상기 게놈 DNA를 주형으로 상기한 프라이머 세트, 등온증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응버퍼를 포함하는 조성물을 이용하여 동온증폭법(LAMP)을 수행하여 표적서열을 증폭시키는 단계; 및 상기 증폭시킨 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 이리도바이러스 검출방법이다.

[0031] 여기서, 상기 시료는 특별히 제한되지 않고, 이리도바이러스를 포함할 것으로예상되는 모든 시료일 수 있으며, 예를 들어 어류 샘플, 가축이나 동물, 또는 식물 샘플인 것도 가능하다. 그 중에서도, 상기 시료는 이리도바이러스가 가장 잘 발생하는 어류인 것이 바람직하고, 상기 어류는 참돔, 돌돔, 감성돔, 방어류, 부시림, 농어 및 전갱이류로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0032] 또한, 상기 등온증폭법은 등온조건하에서 실시하게 되는데, 바람직한 것은 63℃ 내지 65℃에서 30분 내지 2시간 동안 수행하는 것이다. 만약, 상기 온도범위 및/또는 상기 시간 범위를 벗어나는 경우에는 증폭이 느리게 진행되거나 증폭이 일어나지 않는 문제점이 있다.

[0033] 또한, 상기 증폭시킨 산물을 검출하는 단계는 전기영동(electrophoresis) 또는 SYBR Green I을 이용하여 증폭된 DNA를 확인하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명은 상기 LAMP 증폭하여 생성된 생성물에 감염여부의 육안 확인을 위한 발광물질을 첨가하는 단계를 더 실시할 수 있다. 즉, 상기한 프라이머 세트를 포함하는 반응액을 만들고, 여기에 시료를 첨가하여 DNA 합성을 진행한 후 발광물질을 첨가하는 것이 가능하다. 상기 발광물질은 당해분야에서 일반적으로 사용되는 것을 적용할 수 있으나, 바람직하게는 SybrGreen을 사용하는 것이 가능하다.

[0034] 상기 SybrGreen은 DNA 이중가닥에 결합하는 특성을 이용하여 추가적 실험을 필요로 하지 않고도 결과의 여부를 판독할 수 있도록 하기 위하여 첨가한 것이다. 특히, 상기 SybrGreen은 DNA 이중 가닥에 삽입되어 자외선 조사시 녹색의 형광을 발현하는 물질이다. 따라서 이리도바이러스에 감염된 시료를 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용하여 LAMP법으로 증폭시키고, 증폭된 생성물에 SybrGreen을 첨가한 후 자외선을 조사하게 되면 녹색 형광을 나타내게 된다. 즉, 본 발명은 전기영동 등 별도의 추가적 실험을 하지 않고도 LAMP 증폭실험 후 SybrGreen 염색에서 녹색형광을 나타내면 질병에 감염된 것을 의미하고, 녹색형광을 나타내지 않으면 비감염을 의미하므로 시료에 이리도바이러스가 포함되었는지 또는 감염되었는지의 여부를 고감도이면서 신속하게 육안으로 확인할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에서는 상기 프라이머 세트를 포함하는 진단용 키트를 제공한다. 상기 진단용키트는 필요에 따라서 시료를 제외한 반응액이 포함되도록 제작될 수도 있으며, 이는 공지기술을 적용하면 용이하게 실시할 수 있는 것이다.

[0036] 이와 같은 본 발명에 따른 등온증폭 반응용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 프라이머 조성물 및 이를 이용한 검출방법을 이용하면, 단시간 내에 전문장비 없이 효과적으로 이리도바이러스를 검출할 수 있다. 또한, 고농도의 SYBR Green I을 이용하면 자연광하에서 육안으로 신속하게 진단할 수 있다. 따라서 참돔, 돌돔, 감성돔, 방어류, 부시림, 농어, 전갱이류와 같은 양식어가에 막대한 피해를 줄 수 있는 바이러스를 조기에 검출 가능하게 하여 보다 신속하고 효율적인 Red sea bream iridovirus (RSIV) 진단 시스템을 구축할 수 있을 뿐만

아니라, 이를 통해 바이러스 감염으로 인한 경제적 손실을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

[0037] 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 더 잘 이해 될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명의 예시 목적을 위한 것이며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 한정되는 보호범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1: 이리도바이러스 주형 제작

[0039] **실시예 1-1 : Red sea bream iridovirus (RSIV) 유전자 합성**

[0040] RSIV 유전자는 NCBI site에서 확인된 GenBank number AB666334.1를 바탕으로 합성해서 사용했다. 유전자의 길이는 1362 bp로 확인되었으며, bioneer 유전자 합성팀에 유전자 합성을 의뢰했다. 유전자 합성은 1000bp 이상의 유전자 합성이 불가능해서 300~400 bp로 나누어 4개의 유전자로 합성했다.

[0041] 하기 표 1은 본 발명의 프라이머 제작에 사용된 Red sea bream iridovirus (RSIV)의 coat protein 서열을 나타내고 있다.

표 1

[0042]

Gene	유전자 서열
RSIV-1st (서열번호1)	GCTAGCATGTCTGCAATCTCAGGTGCGCAGGTAACCAGTGGGTTCATCGACATCTCCGCGTTTGATGCGATGGAGACCCACTTGTAT GGCGGCGACAATGCCGTGACCTACTTTGCCCGTGAGACCGTGCGTAGTTCCTGGTACAGCAAGCTGCCCGTCACCCTATCAAAACAG ACTGGCCATGCTAATTTCGGCCAGGAGTTTAGTGTGACTGTGGCAAGGGGTGGCGACTACCTCATTAATGTGTGGCTGCGTGTTAAG ATCCCCTCCATCACGTCCAGCAAGGAGAACAGCTACATTCGCTGGTGTGATAATTTGATGCACAATCTAGTTGAGGAGGTGTCGGTG TCATTTAACGACCTGGTGGGATCC
RSIV-2nd (서열번호2)	GCTAGCGCACAGACCCTGACCAGCGAGTTCCTTGACTTTTGGAACGCCTGCATGATGCCTGGCAGCAAACAATCTGGCTACAACAAG ATGATTGGCATGCGCAGCGACCTGGTGGGCGGTATCACCAACGGTCAGACTATGCCCGCCGCCTACCTTAATTTGCCCATTCCCCTG TTCTTTACCCGTGACACAGGCCTTGCATTGCCTACTGTGTCTCTGCCGTACAATGAGGTGCGCATCCACTTCAAGCTGCGGCGCTGG GAGGACCTGCTCATCAGCCAGAGCACCCAGGCCGACATGGCCATATCGACTGTCACCCTGGCTAACATTGGCAATGTAGCACCCGCA CTGACCCAGGTGTCCGTGATGGGCGGATCC
RSIV-3rd (서열번호3)	GCTAGCACCTACGCTGTACTGACAAGTGAGGAGCGTGAGGTTGTGGCCCAGTCTAGCCGTAGCATGCTCATTGAGCAGTGTCAGGTG GCGCCTCGTGTGCCTGTCACACCCGTAGACAATTCCTTGGTGCATCTCGACCTGAGGTTCAGTCACCCTGTGAAGGCCTTGTTCTTT GCAGTCAAGCAGGTCACTCACCGCAACGTGCAAAGCCAGTACACCGCGGCCAGTCCCGTGTATGTCAACAACAAGGTGAATCTGCCT TTGCTGGCCACCAATCCCCTGTCCGAGGTGTCGCTCATTTACGAGAACACCCCTCGGCTCCACCAGATGGGAGTAGACTACGGATCC
RSIV-4th (서열번호4)	GCTAGCTTCACATCTGTCGACCCCTACTACTTTGCGCCCAGCATGCCTGAGATGGATGGTGTTATGACCTACTGTTATACGCTGGAC ATGGGCAATATCAACCCTATGGGCTCGACCAACTACGGCCGCCTGTCCCAGGTCACCCTGTCATGTAAGGTGTCGGACAATGCCAAG ACCACCGCGGCGGGCGGTGGAGGCCAGGGCACCGGCTACACGGTCGCCCAAAAGTTTGAACTGGTCGTTATTGCAGTCAACCACAAC ATCATGAAGATTGCTGACGGCGCTGCAGGCTTCCCTATCCTGTAAGGATCC

[0043] **실시예 1-2 : 유전자 연결(Overlapping PCR) 프라이머 작성**

[0044] 상기 실시예 1-1에서 합성된 4개의 유전자를 결합하기 위해서 Overlapping PCR를 수행했다. Overlapping PCR은 유전자 하나당 2개의 프라이머를 제작해서 총 8개의 프라이머를 사용했다. 처음과 마지막의 프라이머(RSIV-1-F 및 RSIV-4-R)를 제외한 6개의 프라이머는 각 유전자의 마지막 염기서열 약 20 bp(하기 표 2에서 굵게 볼드체로 표시된 서열)를 삽입하여 유전자가 결합되도록 유도했다.

[0045] 하기 표 2는 상기 합성된 4개의 유전자를 연결하기 위한 overlapping PCR의 프라이머 서열을 나타낸 것이다.

표 2

[0046]

유전자	프라이머
RSIV-1-F (서열번호 5)	ATGTCTGCAATCTCAGGTGC
RSIV-1-R (서열번호 6)	GGGTCTGTGC**CACCAGGTCGTTAAATGACA**
RSIV-2-F (서열번호 7)	CGACCTGGTG**GCACAGACCCTGACCAG**
RSIV-2-R (서열번호 8)	CAGCGTAGGT**GCCCATCACGGACACCT**
RSIV-3-F (서열번호 9)	CGTGATGGGC**ACCTACGCTGTACTGACAAG**
RSIV-3-R (서열번호 10)	CAGATGTGAA**GTAGTCTACTCCCATCTGGT**

RSIV-4-F (서열번호 11)	AGTAGACTACTTCACATCTGTCGACCCCTA
RSIV-4-R (서열번호 12)	TTACAGGATAGGGAAGCCTG

[0047] 실시예 2: 등온증폭 반응용 프라이머 제작

[0048] Red sea bream iridovirus (RSIV)를 등온증폭법(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)을 통하여 검출하기 위하여 프라이머(primer)를 PrimerExplorer V4를 이용하여 작성하였다. 등온증폭법을 이용하기 위해서는 4개의 프라이머가 하나의 세트로 작용하여야 하는데, 상기 실시예 1에 따라 합성된 유전자의 염기서열을 주형으로 프라이머를 제작했다.

[0049] 하기 표 3은 본 발명에 따른 등온증폭반응용 프라이머 세트의 염기서열을 나타낸 것이다.

표 3

[0050]

	리스트	LAMP 프라이머 서열 (5' - 3')
프라이머 세트 1	Outer 프라이머 F (서열번호13)	GCATTGCCTACTGTGTCTCT
	Outer 프라이머 B (서열번호14)	ACGCTCCTCACTTGTCAGT
	Inner 프라이머 F (서열번호15)	CTCTGGCTGATGAGCAGGTCCTGTACAATGAGGTGCGCATCC
	Inner 프라이머 B (서열번호16)	CCATATCGACTGTCACCCTGGCGTACCTCGGGATCACGGA
프라이머 세트 2	Outer 프라이머 F (서열번호17)	ATCCACTTCAAGCTGCGG
	Outer 프라이머 B (서열번호18)	TGAGCATGCTACGGCTAGA
	Inner 프라이머 F (서열번호19)	TGTTAGCCAGGGTGACAGTCGACTGGGAGGACCTGCTCATC
	Inner 프라이머 B (서열번호20)	CACTGACCCAGGTGTCCGTGACCTCACGCTCCTCACTT
프라이머 세트 3	Outer 프라이머 F (서열번호21)	CAGTCAAGCAGGTCACTCAC
	Outer 프라이머 B (서열번호22)	CACCATCCATCTACGGCATG
	Inner 프라이머 F (서열번호23)	GCCAGCAAAGGCAGATTCACCTGCAACGTCGAAACGGACTA
	Inner 프라이머 B (서열번호24)	TCCGAGGTGTCGCTCATTTACGAGGGGCGACAGATGTGA
프라이머 세트 4	Outer 프라이머 F (서열번호25)	TGTCTGCAATCTCAGGTGC
	Outer 프라이머 B (서열번호26)	ACACTAAACTCCTGGCCGAA
	Inner 프라이머 F (서열번호27)	CGCCATACAAGTGGGTCTCCATGCAGGTAACCAGTGGGTTC
	Inner 프라이머 B (서열번호28)	GTGAGACCGTGCGTAGTTCCTGATTAGCATGGCCAGTCTGT
프라이머 세트 5	Outer 프라이머 F (서열번호29)	CGACAATGCCGTGACCTAC
	Outer 프라이머 B (서열번호30)	GCGAATGTAGCTGTTCTCCT
	Inner 프라이머 F (서열번호31)	GCCGAAATTAGCATGGCCAGTCAGACCGTGCGTAGTTCCTG
	Inner 프라이머 B (서열번호32)	TTAGTGTGACTGTGGCAAGGGGGACGTGATGGAGGGGATCT

[0051] 실시예 3: 등온증폭 반응의 수행 및 유용성 확인

[0052] 상기 실시예 2에서 제작된 프라이머 세트를 Red sea bream iridovirus (RSIV)를 검출하는데 사용가능한지 확인하기 위하여, 증폭반응용 프라이머 조성물을 제조하였다. 상기 프라이머 조성물의 제조를 위하여 2 uL의 10배(10X) *Bst* 중합효소(polymerase) 반응버퍼(20 mM Tris-HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100), 1.6 ul의 10 mM dNTPs(dATP, dTTP, dGTP, dCTP 각각 10 mM씩 섞인 혼합물), 0.4 ul의 10 uM F3와 B3 프라이머, 1.6 ul의 10 uM FIP와 BIP 프라이머, 1 ul의 20 mM $MgSO_4$, 1 ul(8 Unit) *Bst* 중합효소, 1/10 희석한 주형(실시예 1의 RSIV) cDNA 1 ul, 및 증류수 11.5 ul를 반응튜브에 첨가한 후 혼합하였다.

[0053] 제조된 증폭 반응 조성물을 40 ℃에서 30초 동안 반응 시킨 후 64 ℃ 반응 용기에서 1시간 30분 동안 반응시켜 등온증폭하였다. 반응이 완료된 증폭산물에 1,000배로 농축된 SYBR Green I을 반응물 20 ul 당 1 ul씩 첨가하고, 80 ℃에서 5분간 효소활성을 억제시켜주었다. 총 20 ul의 반응물 중 5 ul를 전기영동(electrophoresis)하여 유전자가 증폭되었는지 확인하였다.

[0054] 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 등온증폭반응용 프라이머 세트를 이용하여 노다바이러스(RSIV)를

증폭시킨 증폭 산물의 전기영동 결과를 자외선 상에서 발색반응으로 확인한 것이다. 여기서, "P"는 positive 시료로서 실시예 1의 RSIV를 주형으로 포함하는 것이고, "N"은 negative 시료로서 상기 주형을 포함하지 않은 시료이며, 숫자 1~5는 각각 상기 표 3에 나타난 바와 같은 프라이머 세트 1~5를 의미한다. 이에 따르면, 상기 프라이머 세트 1~5는 모두 positive 시료에서 녹색 발광을 나타내고 있고, negative 시료에 대해서는 프라이머 세트 3번 및 5번만이 녹색 발광을 띠고 있지 않아서, 프라이머 세트 3번 및 5번이 상기 RSIV 주형과 반응하여 녹색 발광을 띠고 있음을 알 수 있다. 프라이머 세트 1, 2, 4번의 positive 시료에서는 프라이머 간의 반응에 의해 발광된 것으로 판단된다.

[0055] 도 2는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 등온증폭반응용 프라이머 세트를 이용하여 노다바이러스(Viral nervous necrosis virus (VNNV))를 증폭시킨 증폭 산물의 전기영동 결과를 보여주는 도면이다. 즉, 주형으로 Red sea bream nodavirus (RSIV) 대신에 다른 어류 바이러스 Viral nervous necrosis virus (VNNV)를 사용하여 등온증폭법 시행한 것이다. 그 결과, 본 발명의 프라이머 세트 3번 및 5번에 의하면 유전자 증폭이 나타나지 않았고, 결과적으로 3, 5번 프라이머 세트는 특이적으로 Red sea bream nodavirus (RSIV) 유전자에 반응한다는 것을 알 수 있다.

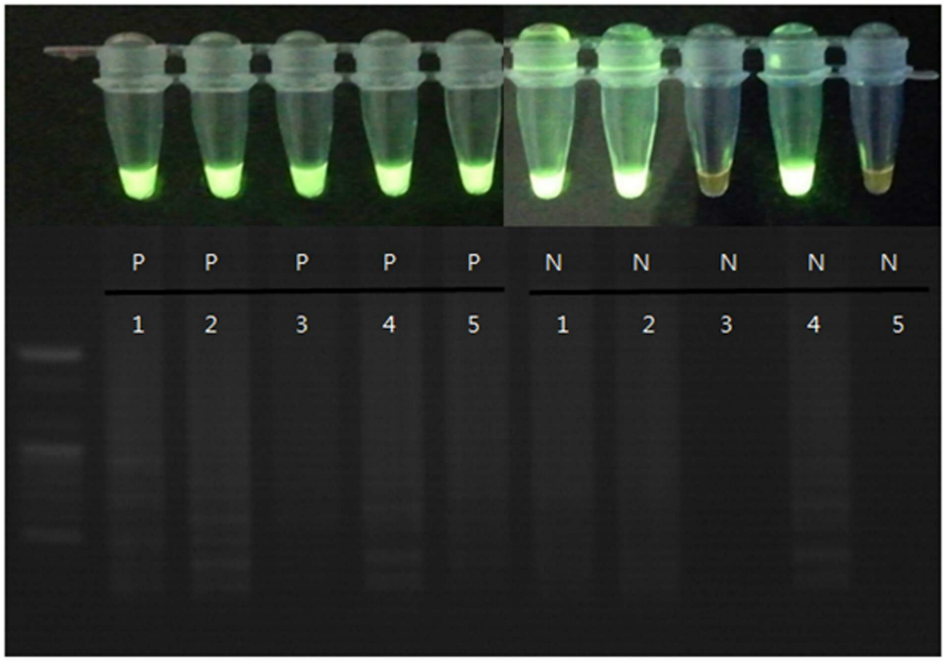
[0056] 도 3은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 유전자를 SYBR Green Ⅰ을 이용하여 자연광원 하에서 확인한 결과를 보여주는 도면이다. 자외선 상에서 발색반응을 확인한 도 1과 비교하여, SYBR Green I을 이용하는 경우에는 자연광 하에서도 명확하게 구분된 결과를 얻을 수 있었다.

[0057] 상기 결과들을 통하여 본 실험에 사용된 프라이머 세트는 Red sea bream nodavirus (RSIV)에만 특이적으로 검출하는데 사용가능하다는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 SYBR GreenI을 10,000배로 농축하여 사용할 경우 자연광 하에서 육안으로 감염여부를 확인할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

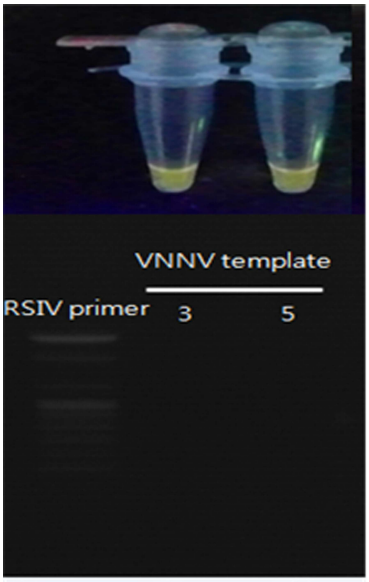
[0058] 한편, 상기에서는 본 발명을 특정의 바람직한 실시예에 관련하여 도시하고 설명하였지만, 이하의 특허청구범위에 의해 마련되는 본 발명의 기술적 특징이나 분야를 이탈하지 않는 한도 내에서 본 발명이 다양하게 개조 및 변화될 수 있다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명백한 것이다.

도면

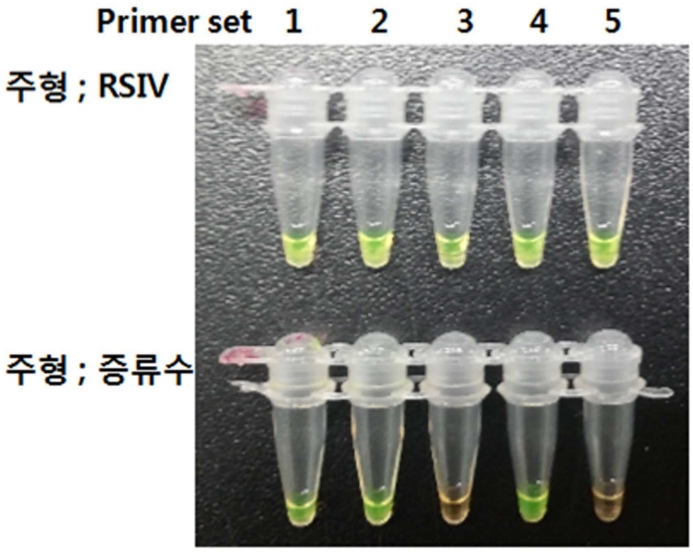
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Korea Institute of Ocean Science & Technology

<120> Primer set for loop-mediated isothermal amplification reaction for detecting iridovirus, Primer composition having the same, and Detecting method using the same

<130> P13-0003

<160> 32

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 372

<212> DNA

<213> Red sea bream iridovirus(RSIV-1st)

<400> 1

gctagcatgt ctgcaatctc aggtgcgcag gtaaccagtg ggttcatcga catctccgcg 60

tttgatgcga tggagaccca cttgtatggc ggcgacaatg ccgtgaccta ctttgcccgt 120

gagaccgtgc gtagttcctg gtacagcaag ctgcccgtca ccctatcaaa acagactggc 180

catgctaatt tcggccagga gtttagtgtg actgtggcaa ggggtggcga ctacctcatt 240

aatgtgtggc tgcgtgttaa gatcccctcc atcacgtcca gcaaggagaa cagctacatt 300

cgctggtgtg ataatttgat gcacaatcta gttgaggagg tgtcggtgtc atttaacgac 360

ctggtgggat cc 372

<210> 2

<211> 378

<212> DNA

<213> Red sea bream iridovirus(RSIV-2nd)

<400> 2

gctagcgcac agaccctgac cagcgagttc cttgactttt ggaacgcctg catgatgcct 60

ggcagcaaac aatctggcta caacaagatg attggcatgc gcagcgacct ggtgggcggt 120

atcaccaacg gtcagactat gcccgccgcc taccttaatt tgcccattcc cctgttcttt 180

acccgtgaca caggccttgc attgcctact gtgtctctgc cgtacaatga ggtgcgcatc 240

cacttcaagc tgcggcgctg ggaggacctg ctcatcagcc agagcaccca ggccgacatg 300

gccatatcga ctgtcaccct ggctaacatt ggcaatgtag cacccgcact gacccaggtg 360

tccgtgatgg gcggatcc 378

<210> 3

<211> 348

<212> DNA

<213> Red sea bream iridovirus(RSIV-3rd)

<400> 3

gctagcacct acgctgtact gacaagtgag gagcgtgagg ttgtggccca gtctagccgt 60

agcatgctca ttgagcagtg tcaggtggcg cctcgtgtgc ctgtcacacc cgtagacaat 120

tccttggtgc atctcgacct gaggttcagt caccctgtga aggccttgtt ctttgcagtc 180

aagcaggtca ctcaccgcaa cgtgcaaagc cagtacaccg cggccagtcc cgtgtatgtc 240

aacaacaagg tgaatctgcc tttgctggcc accaatcccc tgtccgaggt gtcgctcatt 300

tacgagaaca cccctcggct ccaccagatg ggagtagact acggatcc 348

<210> 4

<211> 312

<212> DNA

<213> Red sea bream iridovirus(RSIV-4th)

<400> 4

gctagcttca catctgtcga cccctactac tttgcgccca gcatgcctga gatggatggt 60

gttatgacct actgttatac gctggacatg ggcaatatca accctatggg ctcgaccaac 120

tacggccgcc tgtcccaggt caccctgtca tgtaaggtgt cggacaatgc caagaccacc 180

gcggcgggcg gtggaggcca gggcaccggc tacacggtcg cccaaaagtt tgaactggtc 240

gttattgcag tcaaccacaa catcatgaag attgctgacg gcgctgcagg cttccctatc 300

ctgtaaggat cc 312

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-1-F

<400> 5

atgtctgcaa tctcaggtgc 20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-1-R

<400> 6

gggtctgtgc caccaggtcg ttaaatgaca 30

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-2-F

<400> 7

cgacctggtg gcacagaccc tgaccag 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-2-R

<400> 8

cagcgtaggt gcccatcacg gacacct 27

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-3-F

<400> 9

cgtgatgggc acctacgctg tactgacaag 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-3-R

<400> 10

cagatgtgaa gtagtctact cccatctggt 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-4-F

<400> 11

agtagactac ttcacatctg tcgaccccta 30

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSIV-4-R

<400> 12

ttacaggata gggaagcctg 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer forward primer for primer set 1

<

400> 13

gcattgccta ctgtgtctct 20

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer backward primer for primer set 1

<400> 14

acgctcctca cttgtcagt 19

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner forward primer for primer set 1

<400> 15

ctctggctga tgagcaggtc ctgtacaatg aggtgcgcat cc 42

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner backward primer for primer set 1

<400> 16

ccatatcgac tgtcaccctg gcgtacctcg ggatcacgga 40

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer forward primer for primer set 2

<400> 17

atccacttca agctgcgg 18

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer backward primer for primer set 2

<400> 18

tgagcatgct acggctaga 19

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner forward primer for primer set 2

<400> 19

tgttagccag ggtgacagtc gactgggagg acctgctcat c 41

<210> 20

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner backward primer for primer set 2

<400> 20

cactgaccca ggtgtccgtg acctcacgct cctcactt 38

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer forward primer for primer set 3

<400> 21

cagtcaagca ggtcactcac 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer backward primer for primer set 3

<400> 22

caccatccat ctacggcatg 20

<210> 23

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner forward primer for primer set 3

<400> 23

gccagcaaag gcagattcac ctgcaacgtc gaaacggact a 41

<210> 24

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner backward primer for primer set 3

<400> 24

tccgaggtgt cgctcattta cgaggggcga cagatgtga 39

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer forward primer for primer set 4

<400> 25

tgtctgcaat ctcaggtgc 19

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer backward primer for primer set 4

<400> 26

acactaaact cctggccgaa 20

<210> 27

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner forward primer for primer set 4

<400> 27

cgccatacaa gtgggtctcc atgcaggtaa ccagtgggtt c 41

<210> 28

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner backward primer for primer set 4

<400> 28

gtgagaccgt gcgtagttcc tgattagcat ggccagtctg t 41

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer forward primer for primer set 5

<400> 29

cgacaatgcc gtgacctac 19

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Outer backward primer for primer set 5

<400> 30

gcgaatgtag ctgttctcct 20

<210> 31

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner forward primer for primer set 5

<400> 31

gccgaaatta gcatggccag tcagaccgtg cgtagttcct g 41

<210> 32

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Inner backward primer for primer set 5

<400> 32

ttagtgtgac tgtggcaagg gggacgtgat ggaggggatc t 41