(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0024811
(43) 공개일자 2010년03월08일

(51) Int. Cl.
C12N 7/02 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0083537
(22) 출원일자 2008년08월26일
심사청구일자 2008년08월26일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
조장천
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 자연과학대학 생명해양과학부
추여진
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 자연과학대학 생명해양과학부
송재호
인천광역시 남구 용현4동 인하대학교 자연과학대학 생명해양과학부
(74) 대리인
이은철, 유완식

전체 청구항 수 : 총 6 항

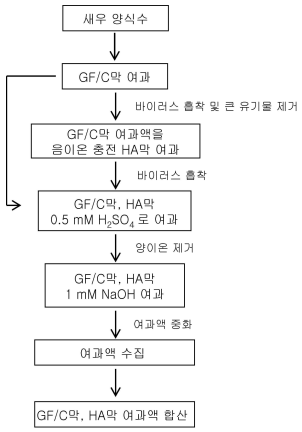
(54) 흰반점 바이러스 농축방법

(57) 요 약

본 발명은 한국산 새우에서 발병하는 WSSV 농축방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, GF/C와 음이온 충전 HA 여과막 (0.45㎛, 45㎜ dia)에 천천히 여과하여 바이러스가 해수 속에 존재하고 있는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록 하고, 바이러스가 흡착된 GF/C와 HA 여과막에 0.5mM H_2SO_4로 양이온들을 씻어 내고 2.5㎖의 1mM NaOH을 첨가하여 바이러스를 회수한 즉시 50mM H_2SO_4로 중화하고 TE 완충용액으로 안정화한 다음 Vivaspin(Sartorius) 컬럼을 사용하여 농축하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 적은 해수시료에서 바이러스를 농축하여 새우 양식장에서 바이러스 오염을 모리터링 할 수 있으므로, 시간과 노력을 절감할 수 있어 경제적이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	35924-8
부처명	교육인적자원부
연구사업명	지역혁신센터(RIC)사업
연구과제명	서해 새우양식장에서의 새우질병 유발 환경요인 추적
주관기관	인하대학교 산학협력단
연구기간	2007년 03월 01일 ~ 2008년 02월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

(1) 새우 양식수를 유리 섬유 여과지 (Glass fiber filter; GF)로 여과하는 단계;

(2) 바이러스가 양식수에 존재하는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록, 상기 여과액을 음이온 충전 HA 여과막에 천천히 여과하는 단계;

(3) 상기 유리 섬유 여과지 및 HA 여과막을 H_2SO_4로 세척하여 양이온을 제거하는 단계;

(4) NaOH를 첨가하여 바이러스를 회수하는 단계; 및

(5) 회수한 바이러스를 H_2SO_4로 중화시키고 완충용액으로 안정화시킨 다음, 컬럼을 사용하여 농축시키는 단계;를 포함하는 흰반점 바이러스 농축방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 유리 섬유 여과지는 C 타입 또는 F 타입인 것을 특징으로 하는 농축방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

단계 (3)에서 사용된 H_2SO_4는 0.1mM 내지 5mM의 범위를 가지는 것을 특징으로 하는 농축방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

NaOH는 0.1mM 내지 10mM 이고, pH 7 내지 pH 12의 범위를 가지는 것을 특징으로 하는 농축방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

단계 (5)에서 사용된 H_2SO_4는 10mM 내지 100mM의 범위를 가지는 것을 특징으로 하는 농축방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 완충용액은 TE 완충용액인 것을 특징으로 하는 농축방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 한국산 새우에서 발병하는 WSSV 농축방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, GF/C와 음이온 충전 HA 여과막 (0.45㎛, 45㎜ dia)에 천천히 여과하여 바이러스가 해수 속에 존재하고 있는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록 하고, 바이러스가 흡착된 GF/C와 HA 여과막에 0.5mM H_2SO_4로 양이온들을 씻어 내고 2.5㎖의 1mM NaOH을 첨가하여 바이러스를 회수한 즉시 50mM H_2SO_4로 중화하고 TE 완충용액으로 안정화한 다음 Vivaspin(Sartorius) 컬럼을 사용하여 농축하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 본 발명은 국내 새우 양식장의 양식수에서 흰반점 바이러스(White Spot Syndrome Virus; 이하 'WSSV'로 약칭

한다)의 검출 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 바이러스를 검출하기 위하여 양식수를 효과적으로 농축하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0003] WSSV는 아시아 및 북아메리카의 연안에서 양식되는 새우에 감염하여 대량폐사를 일으키는 전염성이 강한 바이러스이다. WSSV는 림프기관, 조혈기 조직, 아가미, 장, 위, 중앙신경조직, 피하조직 및 촉각선을 포함하는 중배엽 및 외배엽의 다양한 조직으로 감염되어, 각 감염조직에 심각한 피해를 주어 대량폐사를 유발한다. 감염경로는 모체로부터 자손에게 직접 감염(수직감염)되며, 감염된 개체군이나 양식장 주변의 게나 속 등의 갑각류에게 감염(수평감염)되는 것으로 알려져 있다. WSSV에 감염된 새우는 두흉갑과 체표에 불규칙한 영지버섯 모양의 백색 무늬가 형성되며, 새우의 간췌장(hepatopancreas)이 붉은색을 띠게 되고, 수일 만에 대부분 폐사한다. WSSV는 1992년 중국에서 최초로 보고된 이래 일본, 대만, 아메리카 대륙에서 발병한다. 이 때문에 국제수역사무국(OIE)은 1998년 흰반점바이러스를 1급 전염병으로 지정했다. 한국에서는 1993년 서해안 지역의 대하와 보리새우 양식장에서 처음 발견되었으면 해마다 새우 양식산업에 많은 피해를 가져왔다.

[0004] WSSV의 유전체의 크기는 약 290~305kb에 이르고 이중 나선형 DNA바이러스이다. 길이는 약 275㎚, 넓이는 약 120㎚인 막대모양이다. WSSV는 비리온(virion)과 피막(envelop)을 가지는 rod 형태이다. WSSV는 15~28kDa의 크기를 가지는 5개의 주요한 단백질을 가지고 있는데, 피막(envelop)에는 VP28 및 VP19가 존재하고, 비리온(virion)에는 VP26, VP24, VP15 세 개의 주요한 단백질이 존재하며, 이것은 바이러스 입자 표면에 위치하여, WSSV의 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[van Hulten MC. et al., Virol., 1, 7-22(2001)]. WSSV의 감염은 새우뿐만 아니라 여러 갑각류에서 나타나고 플랑크톤 또한 중간 숙주의 역할을 하는 것으로 알려져 있다. WSSV의 경우 인공적으로 배양이 어렵고, 척추동물과는 달리 백신을 개발하기 어렵다. 따라서 WSSV는 지속적인 새우양식을 위협하는 핵심인자로 양식장 내에서 조절되어져야 하며 질병유발 인자를 속히 검출하는 것이 피해를 방지할 수 있는 유일한 길이다. 그러나 고전적인 해양생물체의 검출 및 동정 방법으로는 시간과 노력이 많이 들며 false-positive, false-negative 결과를 야기하는 단점이 있으므로 질병유발인자들을 분자생물학적인 방법에 의해 조기에 검출하는 것이 매우 중요하다.

[0005] WSSV 감염의 진단을 위한 종래 기술은 WSSV 염기서열에 기초하여 프라이머를 고안하여 핵산을 증폭하는 중합효소 chain reaction(PCR)방법, 유전자 탐침을 이용한 in situ hybridization 방법, 발현 단백질을 항원으로 사용하여 그로부터 항체를 검출하는 면역학적 방법 등이 있다. 그러나 위의 방법들은 민감도와 정량화라는 점에서는 다소 제약이 있다. 최근에는 이러한 단점을 극복하고자 장관계 바이러스의 검출에 많이 이용된 정량 실시간 핵산증폭(Quantitative Real-time PCR; 이하 'QRT-PCR'로 약칭한다)방법이 WSSV 검출에 적용되었다. SYBR Green 형광시료나 Taqman 프로브를 주로 사용하는 QRT-PCR 방법은 실시간으로 증폭된 핵산의 양을 정량하여 신속하게 WSSV의 존재 및 양을 검출할 수 있지만 한국에서는 QRT-PCR을 이용한 WSSV 검출 방법이 개발되지 않았다. 또한 종래의 WSSV의 연구는 새우 조직에만 국한되어, 새우의 일차적인 오염원인 양식수에서 바이러스를 효과적으로 검출하는 방법이 개발되지 않았다. 따라서 한국에서 발생하는 특유의 WSSV 서열을 확인하고, 그로부터 새로운 프라이머 및 프로브를 설계해야할 필요가 있다. 또한 양식장의 잠재적 바이러스 감염성을 관찰하기 위해서 양식수를 농축하여 바이러스를 수집하는 기술도 필요하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 새우질병 바이러스는 지속적인 새우양식을 위협하는 핵심인자로 양식장 내에서 조절되어져야 하며 질병유발 인자를 속히 검출하는 것이 피해를 방지할 수 있는 유일한 길이다. 그러나 고전적인 해양생물체의 검출 및 동정 방법으로는 시간과 노력이 많이 들기 때문에 질병유발인자들을 분자생물학적인 방법에 의해 조기에 검출하는 것이 필요하다.

[0007] 그리고, 양식장 해수시료에서 바이러스 농축하는 종래의 기술로는 H. Katayama 등의 방법이 있으나(Katayama, H. et al., Appl. and Environ. Microbiol. 68, 1033-1039(2002)), 새우 양식수에 존재하는 많은 부유물과 유기물이 바이러스가 여과막에 흡착하는 것 방해하므로, 상기 종래 기술에서 사용하는 한가지 여과막을 이용한 바이러스 회수 방법은 양식수에 적용하기에는 무리가 있다.

[0008] 또한 서해안의 지형적, 환경적 특성 때문에 기존의 바이러스를 농축법을 그대로 적용하는 데에는 많은 무리가 존재하여, 한국의 양식 환경의 실정에 맞는 농축방법이 요구되고 있다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 한국산 새우에서 발병하는 WSSV를 고수율로 농축시킬 수 있는 WSSV 농축방법을 제공하

는데 있다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 (1) 새우 양식수를 유리 섬유 여과지 (Glass fiber filter; GF)로 여과하는 단계; (2) 바이러스가 양식수에 존재하는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록, 상기 여과액을 음이온 충전 HA 여과막에 천천히 여과하는 단계; (3) 상기 유리 섬유 여과지 및 HA 여과막을 H_2SO_4로 세척하여 양이온을 제거하는 단계; (4) NaOH를 첨가하여 바이러스를 회수하는 단계; 및 (5) 회수한 바이러스를 H_2SO_4로 중화시키고 완충용액으로 안정화시킨 다음, 컬럼을 사용하여 농축시키는 단계를 포함하는 흰반점 바이러스 농축방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, 상기 유리 섬유 여과지는 C 타입 또는 F 타입인 것이 바람직하고, 단계 (3)에서 사용된 H_2SO_4는 0.1mM 내지 5mM의 범위를 가지는 것이 바람직하며, NaOH는 0.1mM 내지 10mM 이고, pH 7 내지 pH 12의 범위를 가지는 것이 바람직하고, 단계 (5)에서 사용된 H_2SO_4는 10mM 내지 100mM의 범위를 가지는 것이 바람직하며, 상기 완충용액은 TE 완충용액인 것이 바람직하다.

효 과

[0012] 상기와 같이, 본 발명은 한국산 새우에서 발병하는 WSSV 농축방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, GF/C와 음이온 충전 HA 여과막 (0.45㎛, 45㎜ dia)에 천천히 여과하여 바이러스가 해수 속에 존재하고 있는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록 하고, 바이러스가 흡착된 GF/C와 HA 여과막에 0.5mM H_2SO_4로 양이온들을 씻어 내고 2.5㎖의 1mM NaOH을 첨가하여 바이러스를 회수한 즉시 50mM H_2SO_4로 중화하고 TE 완충용액으로 안정화한 다음 Vivaspin(Sartorius) 컬럼을 사용하여 농축하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에 따르면, 적은 해수시료에서 바이러스를 농축하여 새우 양식장에서 바이러스 오염을 모리터링 할 수 있으므로, 시간과 노력을 절감할 수 있어 경제적이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0015] 본 발명은 (1) 새우 양식수를 유리 섬유 여과지 (Glass fiber filter; GF)로 여과하는 단계; (2) 바이러스가 양식수에 존재하는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록, 상기 여과액을 음이온 충전 HA 여과막에 천천히 여과하는 단계; (3) 상기 유리 섬유 여과지 및 HA 여과막을 H_2SO_4로 세척하여 양이온을 제거하는 단계; (4) NaOH를 첨가하여 바이러스를 회수하는 단계; 및 (5) 회수한 바이러스를 H_2SO_4로 중화시키고 완충용액으로 안정화시킨 다음, 컬럼을 사용하여 농축시키는 단계를 포함하는 흰반점 바이러스 농축방법을 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 유리 섬유 여과지는 C 타입 또는 F 타입인 것이 바람직하고, 단계 (3)에서 사용된 H_2SO_4는 0.1mM 내지 5mM의 범위를 가지는 것이 바람직하며, NaOH는 0.1mM 내지 10mM 이고, pH 7 내지 pH 12의 범위를 가지는 것이 바람직하고, 단계 (5)에서 사용된 H_2SO_4는 10mM 내지 100mM의 범위를 가지는 것이 바람직하며, 상기 완충용액은 TE 완충용액인 것이 바람직하다.

[0017] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[0018] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] **실시예 1. 올리고뉴클로오티드 프라이머 및 프로브 제작**

[0020] 본 발명의 QRT-PCR방법을 위한 새로운 프라이머 및 프로브를 제작하였다.

[0021] 강화도에서 흰반점 질병을 보인 흰다리새우를 수거하여 새우의 부속지와 아가미 조직 25㎎에서 로슈사의 High pure viral RNA kit™를 사용하여 바이러스의 핵산을 추출하였다. 추출된 핵산을 주형으로 하고, Yang[Yang, B., et al., J. Fish Dis. 29, 301-305(2001)] 에 의해 발표된 프라이머 W1, W2를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR의 성공 여부를 1.5% agarose로 확인 후, PCR 산물은 TaKaRa Perfect-T cloning kit (TaKaRa)를 사용하여 클로닝을 수행하였다.

[0022] 젤에서 추출한 PCR 산물 4㎕에 pMD-18T 벡터(Takara) 1㎕, 라이게이션 용액 5㎕, 멸균된 증류수 5㎕를 혼합하였다. 혼합물을 16℃에서 30분간 방치하였다가 20㎕의 *E. coli* 컴피던트 세포(competent cell)를 첨가한 다음, 30분간 냉동 배양하였다. 그 후 42℃에서 30초간 열-쇼크(heat-shock)를 가한 다음, 즉시 얼음으로 옮겨 2분간 방치하였다. 미리 실온에서 배양 중이던 SOC 배양 배지 1㎖을 첨가하여 37℃, 150rpm에서 1시간 교반하여 배양하였다. 암피실린(50㎍/㎖), IPTG(100mg/㎖), X-Gal(20mg/㎖)이 포함된 LB plat플레이트 배지에 배양한 SOC 배양액을 100㎕씩 도말하고 37℃에서 24시간 배양 후 PCR을 통해서 형질전환을 확인하였다.

[0023] 상기 형질전환된 *E. coli*의 플라스미드의 염기서열을 Genbank에서 확인한 결과 WSSV 서열(서열번호 1)과 99% 일치함을 확인하고 (RID: 1156315560-7622-146087907255.BLASTQ1), 염기서열 분석결과를 바탕으로 새로운 프라이머와 프로브를 제작하였다(표 1 참조).

[0024] Taqman 프로브로 적합한 서열을 검색하여 프로브를 결정한 후에, 결정된 프로브 사이트를 포함하면서 전체 PCR 산물 크기가 200bp를 넘지 않는 범위 안에서 Tm값이 프로브보다 10℃ 정도 낮은 조건을 만족하는 프라이머를 선정하였다.

[0025] 본 발명에서 사용된 Taqman 프로브는 리포터 염료(reporter dye)로 5'에 6-카르복시-플루오레세인 (FAM)을 적용하였고, 흡광 염료(퀀쳐 dye)로는 FAM에 가장 적합한 BHQ-1 다크 퀀쳐(dark quencher)를 3'에 사용하였다. QRT- PCR의 과정 중 PCR 반응이 일어나지 않아 프로브의 형태가 유지되는 상태에서는 플레이트 판독(plate read) 단계 시에 조사되는 빛에 의해 FAM이 들뜬 상태(excited state)로 되었다가 가까이에 위치한 BHQ1으로 에너지가 이동하여 형광을 보이지 않는 FRET(fluorescence resonance energy transfer)상태가 유지된다.

[0026] PCR반응이 일어나서 목적 서열이 증폭이 되면 프로브가 목적 서열에 교잡하였다가 Taq 중합효소의 5' 엑소뉴클레아즈(exonuclease) 작용에 의해 FAM이 분리가 되면서 퀀쳐인 BHQ1과 멀어지면서 빛에 의한 형광을 보이게 된다. 이 형광의 양을 측정하여 PCR 반응이 일어난 것을 확인할 수 있다.

표 1

[0027] QRT-PCR 방법으로 WSSV 검출하기 위해 사용된 프라이머와 프로브

	서열 (5'→3')	Tm (℃)	GC (mol%)	Size
프라이머 1 (서열번호 2)	TATGGATGAAGACACTTGGAATTC	55.7	37.5	79bp
프라이머 2 (서열번호 3)	GCTGTTCTTCTTCTTCTTCTGC	56.1	45.5	
프로브 (서열번호 4)	FAM-TCCTCCTCCAGCAACGCCCCA-BHQ1	66.2	66.7	

[0028] **실시예 2. 정량분석을 위한 표준**

[0029] 정량분석을 위한 QRT-PCR의 WSSV 농도표준은 위에서 형질전환된 *E. coli* 에서 WSSV가 삽입된 플라스미드를 Plasmid Miniprep kit (DyneBio, Korea)로 추출하였다. 추출한 플라스미드의 260nm 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 계산하였으며 플라스미드 카피 수로 환산하였다. 카피 수가 결정된 이 플라스미드는 이후 QRT-PCR을 위한 WSSV 농도표준으로 사용되었다.

[0030] **실시예 3. QRT-PCR 반응 조건**

[0031] 본 발명의 QRT-PCR은 다음과 같은 조건에 수행되었다.

[0032] Real-time PCR 반응 용액의 조성은 2 × IQ supermix (Roche) 10㎕, 프라이머, 프로브 각각 최종 300nM, 시료 5㎕ 에 멸균증류수로 최종 20㎕로 부피를 맞추었다. QRT-PCR은 Bio-rad 사의 Mini opticon™ (Bio-Rad)을 사용하였다.

[0033] QRT-PCR 반응은 94℃, 3분간 반응 후에 94℃, 15초 멜팅(melting), 60℃, 1분 어닐링(annealing) 후에 형광을 관찰하는 반응을 45회 반복수행을 연이어 하고 30℃, 1분간 쿨링하는 조건으로 설정하였다.

[0034] 검출된 형광의 양은 Mini Opticon 3 (Bio-rad)프로그램에서 분석되었다. 이 프로그램에서 생성된 농도표준 그래프를 기초로 시료 안에 존재하는 WSSV의 농도를 계산하였다. 이를 바탕으로 설정된 QRT-PCR방법이 WSSV 바이러스를 정량적으로 검출이 가능한지 효율성을 검증하였다. 농도표준을 10배씩 희석한 표준곡선(standard curve)을

구하였을 때, 10배 희석한 값에 대하여 Ct (cycle number of threshold) 값이 3.4937 증가하는 양상을 보였으며 회귀분석의 상관계수 R 값이 -0.9983으로 좋은 상관관계를 보였다(도 2 참조).

[0035] **실시예 4. 해수시료에서 바이러스의 검출 방법 확립**

[0036] 먼저 직경이 47㎜이 여과셋트(Nalgen)를 이용해서 양식장 해수 500㎖를 GF/C나 GF/F(;1.2㎛, Whatman) 여과막으로 1차 여과 후에 여과액을 음이온 충전 HA 여과막(;0.45㎛, Millipore)에 천천히 여과하여 바이러스가 해수 속에 존재하고 있는 양이온과 반응하여 여과막에 흡착되도록 하였다. 이후에 GF/C와 HA 여과막을 0.5mM H_2SO_4로 양이온들을 씻어 내고 2.5㎖의 1mM NaOH(pH 10.5)을 첨가하여 바이러스를 회수하였다. 회수한 즉시 50mM H_2SO_4로 중화하고 TE 완충용액로 안정화한 후에 Vivaspin(Sartorius) 컬럼을 사용하여 0.2㎖로 농축하였다. 해수시료의 농축액에서 DNeasy tissue kit(Qiagen)로 바이러스의 핵산을 추출하였다(도 3 참조).

[0037] **실시예 5. 이중 여과법(농축방법)의 효율 검증**

[0038] 이중 여과법의 효율 검증하기 위하여 GF/C와 HA 여과막의 바이러스 회수율을 각각 측정하여 GF/C와 HA 여과막을 함께 사용한 이중 여과법의 바이러스 회수율과 비교하였다. 회수율을 측정하기 위하여 흰반점 바이러스에 감염된 새우의 부속지를 TE 완충용액에서 세포 분쇄기로 절개하였다. 절개액은 8,000rpm의 속도에서 30분 동안 원심분리 시켰다. 원심분리 후에 절개액의 상층액만 분리하여 0.6㎖을 300㎖의 바이러스가 거의 검출되지 않은 새우 양식수에 접종하였다. 접종액 100㎖ 씩 GF/C와 HA 여과막에 각 각 여과하여 바이러스를 회수하였고 100㎖을 이중 여과법을 이용하여 바이러스를 회수하였다. 절개액의 0.2㎖은 초기 접종량의 측정을 위해 핵산 추출 후 QRT-PCR을 수행하였다. 이중 여과법의 효율을 검증하기 위하여 위의 과정을 각 각 다른 세 곳의 새우 양식수에 적용하였고 초기 접종량 또한 10^1 copy부터 10^4 copy까지 다양하게 접종하였다. 도 3에서 GF/C나 음이온 충진된 HA 여과막만 사용할 때 보다 이중 여과방법을 사용할 때, 더 높은 회수율을 보였다(도 4 참조).

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 흰반점 바이러스(WSSV)의 염기서열을 나타낸 것이다.

[0040] 도 2는 흰반점 바이러스(WSSV)의 정량을 위한 절대표준농도 곡선을 나타낸 것이다.

[0041] WSSV nucleocapsid 유전자의 클론으로부터 7.56 × 109 copies/㎕ 농도의 WSSV 절대표준을 확보하여 QRT-PCR에 사용하였다. 이 WSSV 절대표준을 1/10로 연속 희석하여 QRT-PCR의 표준농도곡선을 구하였을 때, log10(WSSV copies)와 Ct (cycle number of threshold)값의 관계는 표준농도곡선에서 상관계수(r^2) 0.9966으로 매우 높게 나타나 제작된 프라이머와 Taqman 프로브가 QRT-PCR에 효과적으로 적용될 수 있음이 확인되었다.

[0042] 도 3은 본 발명의 이중 여과법(농축방법)의 도식화한 것이다.

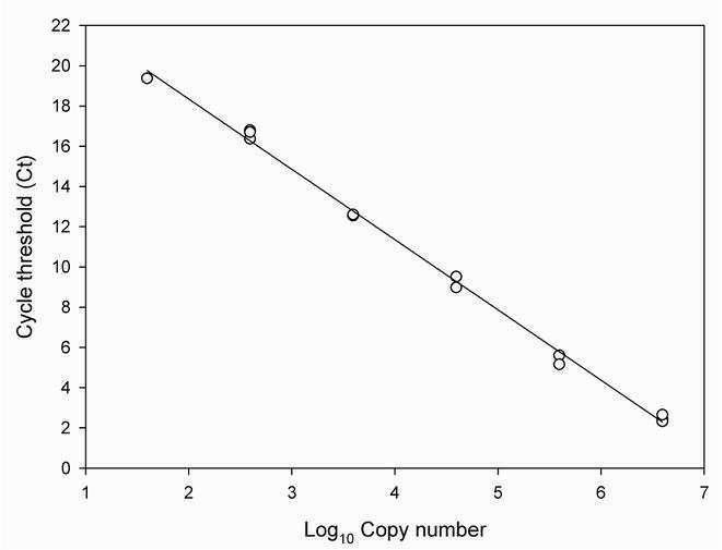
[0043] 도 4는 본 발명의 이중 여과법(농축방법)의 효율을 나타낸 것이다(H; 음이온 충진 HA 여과막, G; GF/C 여과막, D; 이중 여과막).

도면

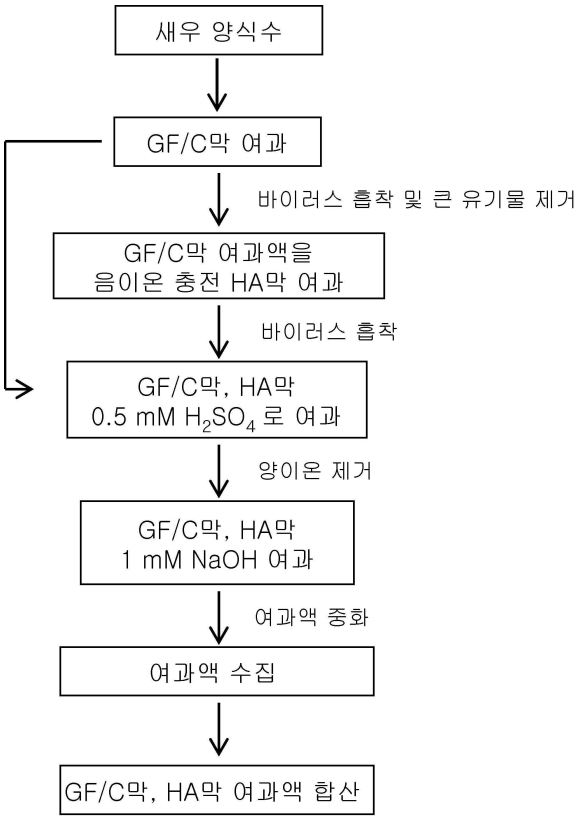
도면1

CACTTGGAATTCTTCCCCTGCCCTGGGGCGTTGCTGGAGGAGGACGCAGA
AGAAGAAGAAGAACAGCTGCCGTTGAACGAGTTTATAGTTTCCAGAAGAC
AACATAATTTAGCTGTAATTGGACGAGGAGACTTCTTGTAATGAGAGAAC
CACAAAATTCTTCTTCCCGTCTTTTCTGGTATAAAAGTAGTCCCATAATA
TGTTCCTTTCTGGACTACCACATTATCTTCGTTTAAGGGAACATATCTGA
CCGACTTTCTCATCAAGGGCTGATCTCCATTTCTTGTTGTGCTTAGAGCC
GATTTGTATTCCCCGTCGTTCACGTTATAGTTGCATATAGAACAGTGGGA
TGAAAGGAACTTGTCGGTTACGTGTTCAGTTTGTACAAGATAACTGGACG
CATTTGCTAGTTCTGGAGGGACGTCCTGGTTTTTGTTTATTGTTGAAGTA
GGTTTTATCTTTTTCCTATTTAAGCACACACCCTTTGAATTAATGTGTAT
GCGATTCGCATTGATGTATATGCAGATTGTGAGTGCTGGAGAAAATGGTA
TCTCAAAATCGGTAGCTGGTTCAATAATTTCTGGTTCAACTTCCTGTTGT
TCTTCTTCCTCATCTTTCTCTTCCTTATTTTTGACACCTAGAACTCTAAG
GTTGGCAGTACTAATTATTCTGGCTGCAGCCGTGCTGGTAGCAGAAGGGG
AAGATTGTTGGGAGATAACAGGAGACATGTTGA

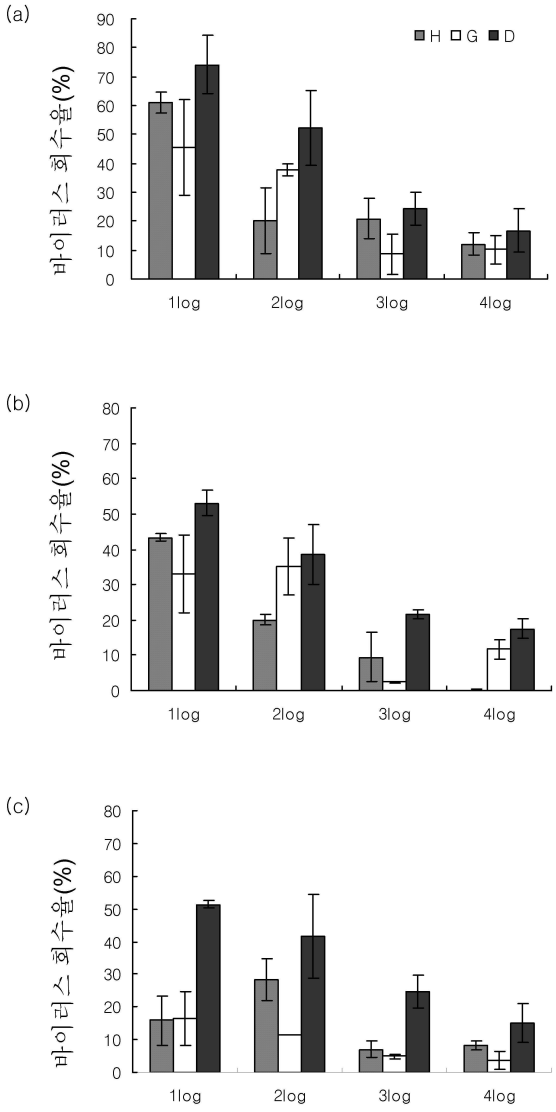
도면2



도면3


새우 양식수
GF/C막 여과
바이러스 흡착 및 큰 유기물 제거
GF/C막 여과액을
음이온 충전 HA막 여과
바이러스 흡착
GF/C막, HA막
0.5 mM H_2SO_4 로 여과
양이온 제거
GF/C막, HA막
1 mM NaOH 여과
여과액 중화
여과액 수집
GF/C막, HA막 여과액 합산

도면4



서 열 목 록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSITITUTE
<120> Method for Concentrating White Spot Syndrome Virus

<130> P08-E244

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 733
<212> DNA

<213> white spot syndrome baculovirus

<400> 1
cacttggaat tcttcccctg ccctggggcg ttgctggagg aggacgcaga agaagaagaa 60

gaacagctgc cgttgaacga gtttatagtt tccagaagac aacataattt agctgtaatt 120

ggacgaggag acttcttgta atgagagaac cacaaaattc ttcttcccgt cttttctggt 180

ataaaagtag tcccataata tgttcctttc tggactacca cattatcttc gtttaaggga 240

acatatctga ccgactttct catcaagggc tgatctccat ttcttgttgt gcttagagcc 300

gatttgtatt ccccgtcgtt cacgttatag ttgcatatag aacagtggga tgaaaggaac 360

ttgtcggtta cgtgttcagt ttgtacaaga taactggacg catttgctag ttctggaggg 420

acgtcctggt ttttgtttat tgttgaagta ggttttatct ttttcctatt taagcacaca 480

ccctttgaat taatgtgtat gcgattcgca ttgatgtata tgcagattgt gagtgctgga 540

gaaaatggta tctcaaaatc ggtagctggt tcaataattt ctggttcaac ttcctgttgt 600

tcttcttcct catctttctc ttccttattt ttgacaccta gaactctaag gttggcagta 660

ctaattattc tggctgcagc cgtgctggta gcagaagggg aagattgttg ggagataaca 720

ggagacatgt tga 733

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
tatggatgaa gacacttgga attc 24

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
gctgttcttc ttcttcttct gc 22

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 4
tcctcctcca gcaacgcccc a 21