

제품번호: AGTC-PQ01-100  
 제조날짜: 20XX. XX. XX  
 로트번호: XXXXX-PQ01-100  
 유효기일: 20XX. XX. XX

### 1. 개요

AquaAmp® Anguilla Viruses Diplex qPCR Kit는 형광 탐침자(hydrolysis probe) 기반의 실시간 PCR (real-time PCR 또는 qPCR) 증폭반응을 통해 뱀장어(*Anguilla*) 속에 속하는 종들(이하 '뱀장어류')에서 흔히 발견되는 병원성 바이러스 2종, 뱀장어헤르페스바이러스(Anguillid herpesvirus-1과 2) (이하 'AnHV')와 뱀장어내피세포괴사증 바이러스(Japanese eel endothelial cell necrosis virus) (이하 'JEECV')를 동시에 정성적이고 정량적으로 검출하는 데 필요한 일체의 qPCR 증폭반응액과 성분들을 포함하는 다중 qPCR 진단키트이다.

### 2. 보관

이 분석키트를 냉동보관하면(-20°C) 1년 이상 활성이 안정적으로 유지된다. 구성성분들의 반복적인 녹임과 얼림은 그 활성을 떨어트리는 주요한 원인이 된다.

### 3. 활용

이 검출키트는 qPCR 증폭반응을 통해 병원성 바이러스 2종, AnHV와 JEECV를 동시에 정성적이고 정량적으로 검출할 수 있다. 이때 이들 바이러스에 감염된 뱀장어류 조직시료에서 추출된 총 DNA뿐만 아니라 이들이 성장하는 사육수 또는 배출수에서 추출된 환경 DNA도 주형 DNA로 사용할 수 있다.

### 4. 장점

#### 1) 특이성

이 검출키트에 사용되는 qPCR 프라이머 조합과 형광 탐침자는 AnHV의 DNA polymerase catalytic subunit (pol) 유전자와 JEECV의 Polyomavirus large T-antigen-like protein (Itlg) 유전자 영역에만 상보적으로 결합하므로 숙주뿐만 아니라 기존에 알려진 병원성 미생물과는 반응하지 않아 특이성이 높다.

#### 2) 보존성

이 검출키트에 사용되는 qPCR 프라이머 조합과 형광 탐침자는 NCBI의 GenBank 데이터베이스에 등록된 AnHV의 pol 유전자와 JEECV의 Itlg 유전자의 모든 유전형에서 공통으로 발견되는 DNA 염기 서열에 상보적으로 결합하므로 보존성이 높다.

#### 3) 신속성

이 검출키트는 형광 탐침자를 사용하는 qPCR 증폭반응에 기초하므로 병원성 바이러스 2종의 감염 여부를 동시에 진단할 수 있고 이들의 입자수를 정량적으로 분석할 수 있다.

#### 4) 편리성

이 검출키트는 DNA 중합효소, qPCR 완충액, dNTP mix, AnHV와 JEECV의 프라이머 조합 등을 모두 포함하는 qPCR Mastermix, 각 종의 형광 탐침자, ROX™ Dye, 양성대조물질, 멸균증류수를 포함한다. 따라서 각 종의 qPCR 증폭반응을 동시에 수행하는 데 필요한 모든 성분이 포함되어 있으므로 감염조직의 총 DNA, 사육수 또는 배출수의 환경 DNA 등만 준비되면 즉시 분석할 수 있어 편리성이 우수하다.

### 5. 구성성분

Anguilla Viruses qPCR Mastermix [DNA 중합효소(0.5 U), 1× qPCR 완충액, MgCl<sub>2</sub> (4 mM), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 각 600 mM), 순방향과 역방향 프라이머(각 0.5 μM), 멸균증류수](●), AnHV 형광 탐침자(0.5 μM, 총 100 μl) (●), JEECV 형광 탐침자(0.5 μM, 총 100 μl) (●), ROX™ dye (●), 멸균증류수(○), 양성대조물질[각 종의 프라이머와 형광 탐침자가 결합하는 영역을 포함하는 DNA 단편이 삽입된 plasmid DNA (100,000 copies/μl, 총 10 μl)] (●)

### 6. 사용방법

#### 1) qPCR 증폭반응액

이 검출키트에 포함된 Anguilla Viruses qPCR Mastermix (●), ANHV 형광 탐침자(●), JEECV 형광 탐침자(●), ROX™ dye (●), 멸균증류수(○)를 얼음 위에서 완전히 녹이고, 준비된 주형 DNA와 함께 아래의 조성표에 따라 각 성분을 PCR 튜브에 순서대로 첨가한다.

| Reagent                             | Amount       |
|-------------------------------------|--------------|
| Anguilla Viruses qPCR Mastermix (●) | 12 μl        |
| ANHV hydrolysis probe (FAM) (●)     | 1 μl         |
| JEECV hydrolysis probe(HEX) (●)     | 1 μl         |
| ROX™ dye (●)                        | 1 μl         |
| Template DNA                        | 1-5 μl       |
| Sterile water (○)                   | up to 20 μl  |
| <b>Total volume</b>                 | <b>20 μl</b> |

(1) 이 검출키트를 처음 개봉하여 사용할 때 동봉된 양성대조물질(●)을 주형 DNA로 사용하는 qPCR 증폭반응을 함께 수행하여 제품의 안정성을 검증한다. 이때 예상되는 C<sub>q</sub> 값이 확인되지 않으면 제품의 유효기일과 PCR 증폭장치의 이상 여부를 확인한다. 그 결과 아무런 이상이 발견되지 않으면 아래의 주소로 연락하여 제품을 교환받거나 환불받는다.

(2) qPCR 증폭반응에 사용되는 반응액은 cooling block (-20°C) 위에서 만드는 것을 권장한다.

(3) 준비된 주형 DNA의 흡광도값(A<sub>260/280</sub>)이 1.8-2.0의 범위이고, 농도는 2-50 ng/μl일 때 통상 이상적인 qPCR 증폭반응이 일어난다.

#### 2) qPCR 증폭반응 조건

아래와 같은 조건으로 qPCR 증폭반응을 수행한다.

| Step                     | Temp. | Time  | No. cycle |
|--------------------------|-------|-------|-----------|
| Initial denaturation     | 95°C  | 5 min | 1         |
| Denaturation             | 95°C  | 15 s  | 40        |
| Annealing and elongation | 63°C  | 1 min |           |

#### 3) qPCR 결과해석

이 검출키트를 사용하여 qPCR 증폭반응을 수행하여 도출된 결과(C<sub>q</sub> 값)를 AnHV와 JEECV의 DNA 단편수(copy number)로 환산하기 위해 양성대조물질[각 종의 plasmid DNA (100,000 copies/μl)](●)을 멸균증류수(○)로 10배씩 희석하고 qPCR 증폭반응을 수행한다. 이를 통해 얻은 C<sub>q</sub> 값과 양성대조물질의 예상되는 단편수를 바탕으로 검량선을 작성한다. 이때 상관계수(r<sup>2</sup>)는 0.90 이상이어야 한다. 각 종의 C<sub>q</sub> 값이 각각 34 이상에서 검출되면 그 단편수는 10개 이하에 해당하므로 정량적 해석이 불가능하다.

### 7. 기타

1) AquaAmp®는 아쿠아진텍(주)의 대한민국 특허청 등록상표이다.

2) AquaAmp® Anguilla Viruses Diplex qPCR Kit는 국립수산물과학원 국유특허의 전용실시권 실시계약을 체결하고 이전받은 대한민국 특허청 등록기술(제10-2239384호)을 사용하여 제작되었다. 특허권자의 사전허가 없이 이 기술을 사용할 수 없으며, 이 검출키트를 제3자에게 재판매하거나 재포장 또는 재가공하여 양도할 수 없다.

3) 이 검출키트는 연구용으로만 사용될 수 있으며, 인간, 동물 등 의 진단용으로 사용될 수 없다.

4) 이 검출키트에 적용된 기술에 대한 자세한 내용은 아래의 출판된 과학논문을 참조한다.

- Song, J.-Y., Kim, K.-Y. and Kim, A. 2025. Highly sensitive duplex quantitative PCR assay for simultaneous detection of two Japanese eel viruses, anguillid herpesvirus and Japanese eel endothelial cells-infecting virus. Biology, 14, 264.