

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)

작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업
2023년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004602-01

RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템개발

2024. 06. 12.

주관연구기관 / (주)엘씨엠싸이언스
공동연구기관 / 강원대학교 산학협력단

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템 개발”(개발기간 : 2021. 04. ~ 2023. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 06. 05.

주관연구기관명 : 엘씨엠사이언스 (대표자) 이해경



공동연구기관명 : 강원대산학협력단 (대표자) 장철성



주관연구책임자 : LEE HYEONG WOO (인)



공동연구책임자 : 홍진성 (인)



국가연구개발혁신법 제17조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급	
										일반[✓], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)		진단기술 산업화				
공고번호		제 농축2021-25호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)						
					연구개발과제번호		321105-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명					
	농림식품과학기술분류	1순위 소분류 코드명	%	2순위 소분류 코드명	%	3순위 소분류 코드명					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템 개발							
		영문		Development of field diagnosis system for plant diseases of major crops using RPA probe assay							
주관연구개발기관		기관명		엘씨엠사이언스(주)		사업자등록번호		385-81-00818			
		주소		(우) 18589 경기도 화성시 향남읍 백토리 161-10		법인등록번호		110111-6339174			
연구책임자		성명		Lee Hyeong Woo		직위		사장			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호		11559730			
연구개발기간		전체		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31 (2년 9개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31 (1년 9개월)					
				2단계		2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년 개월)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()		합계		연구개발비 외 지원금	
		현금		현금		현물		현금		현물	
총계		935,000		6,700		175,600		0		0	
1단계		1년차		255,000		-		55,000		0	
		2년차		340,000		-		60,300		0	
2단계		1년차		340,000		6,700		60,300		0	
		n년차									
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		강원대학교		홍진성		교수				비고 역할 기관유형 공동 대학	
		전남대학교		정래동		교수				위탁 대학	
연구개발기관 외 기관											
연구개발담당자 실무담당자		성명		이슬찬		직위		과장			
		연락처		직장전화		휴대전화					
				전자우편		국가연구자번호		11857212			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024 년 05 월 30 일

연구책임자: Lee Hyeong Woo

주관연구개발기관의 장: (주) 엘씨엠사이언스
 공동연구개발기관의 장: 강원대학교산학협력단장
 위탁연구개발기관의 장: 전남대학교산학협력단장

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		작물바이러스 및 병해충대응 산업 화 기술개발사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				
내역사업명 (해당 시 작성)		진단기술 산업화		연구개발과제번호		321005-3		
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LA0702	%	2순위 LB0304	%	3순위 LB0206	%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 CA0102	%	2순위 RA0301	%	3순위 AA0299	%	
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템 개발						
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2023. 12. 31						
총 연구개발비		총 1,117,300 천원 (정부지원연구개발비:935,000 천원, 기관부담연구개발비 : 182,300 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)						
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(7)		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용		최종 목표		식물병 현장진단 구축 시스템으로 기존 진단법의 효율성의 한계를 극복하는 검정 체계를 구축하며, 조기진단에 대한 과학적 근거 확보				
		전체 내용		○주요작물 RPA(Recombinase Polymerase Amplification) probe 설계 (대상 바이러스; 과수류-6종, 화훼류-6종, 콩과-5종, 십자화과-4종, 가지과-5종) ○RPA 적용을 위한 전처리 기술 개발 ○RPA 적용법을 이용한 식물병 진단 시스템 개발 ○RPA를 통한 진단 시스템의 효율성 검증				
		1단계 (해당 시 작성)		목표	주요작물 RPA probe 설계 및 RPA적용을 위한 전처리기술 개발			
				내용	○주요작물 RPA probe 설계 - 기존 식물병 진단 시스템에 대한 RPA 대체 방안 검토 - 주요작물의 주요 병원균별 RPA probe DB 구축 - RPA 분석이 적용 가능한 식물병(바이러스) 리스트 확정 ○RPA 적용을 위한 전처리 기술 개발 - 작물별 전처리 기술 개발 및 공정 확보 - 주요작물 전처리용 buffer 개발			
		2단계 (해당 시 작성)		목표	RPA 적용법을 이용한 식물병 진단 시스템 개발			
				내용	○RPA 적용법을 이용한 식물병 진단 시스템 개발 - 작물별 주요 바이러스 및 병충해에 대한 진단 프로세스 개발 및 체계 구축 - 작물별 주요 바이러스 및 병충해에 대한 진단 한계 검증 - 주요병에 대한 조기진단 및 시스템 프로세스 구축 - 주요작물(채소, 화훼류, 과실류 등 5건 이상)에 대한 현장진단 공정 설계 및 검증 ○RPA를 통한 진단 시스템의 효율성 검증 - 정성, 정량 분석법 PCR(Conventional RT-PCR, Real-time RT-PCR) 방식 및 immunostrip 방법 등과 진단 비교 및 분석(선택성, 재현성, 민감 도, 진단 시간 등) - 현장 적용가능한 기준 마련 - 진단에 따른 비용, 시간, 전문가 활용성, 상품성 등에 대한 편의 분석			
연구개발성과		고용창출: 4건 학술발표: 6건						

	국외학술지발표: 4건 제품화: 18건 특허출원: 8건 기타(생명정보등록): 2건
--	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	○ 활용계획 - RPA 기반 식물바이러스 현장 정밀 진단 기법 개발 및 키트 실용화에 활용 - 식물바이러스병에 대한 정밀 현장진단법을 개발하여 돌발바이러스 대응을 위한 신속 정밀 현장진단에 활용 - 식물바이러스 국가검역대응을 위한 등온기반 현장정밀진단법 개발에 활용 ○ 기대효과 - 식물바이러스 정밀 진단 플랫폼 구축으로 사용자 수요 맞춤 진단키트의 산업화 기대 - 식물바이러스 정밀 진단 기술 개발 및 관련 제품 생산으로 핵심 기술 역량 확보 및 관련 산업 활성화 - 식물바이러스 진단 미래시장 선점을 위한 기반기술 확보로 국내기업의 글로벌 진출을 위한 기술경쟁력 향상 - 식물바이러스 피해로 인한 노동 및 자본감소에 따른 농산업 효율성 강화 및 농가 수익 향상 - 식물바이러스 피해병 최소화에 의한 농산업 효율성 강화 및 농가 수익 향상
---------------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	4	8	1					2				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	재조합효소-종합 효소 증폭법		바이러스 검출법		식물병		등온핵산증폭		휴대용			
영문핵심어 (5개 이내)	RPA(Recombinase Polymerase Amplification)		Virus detection method		Plant disease		Isothermal nucleic acid amplification		Portable			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 -----	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용 -----	3
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 -----	3
4. 목표 미달 시 원인분석 -----	366
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 -----	367
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 -----	368

별첨 자료 (참고 문헌 등)

1. 연구개발과제의 개요

■ 다양한 환경 변화에 따른 신·변종 작물 바이러스, 병해충의 증가로 생산성·품질 저하 등 경제적 피해가 매우 큰 상황으로 관련 대응 체계 마련 필요

- * 원예, 식량작물 등의 바이러스 감염 피해는 연간 약 1조원 수준(식물바이러스연구회)
- ** '00년 이후 34종(병 20종, 해충 14종)이 국내 유입되어 연간 5천억원 이상 피해

■ 신·변종 바이러스 등장 및 신규·돌발 병해충 발생 증가에 따른 막대한 경제적 피해 발생

- '15~'17년 3년간 전 세계적으로 국제저널에 보고된 신·변종 및 최초 보고된 바이러스는 총 734건이며, 동 기간 국내는 70건 보고
 - 국제교역 증가, 해외 여행 확대 등 환경 변화로 기존의 연구 방식과 지원 체계로는 신·변종 바이러스에 대응이 어려운 상황
 - 국내에 발생하는 식물 바이러스는 약 200종으로 추정되며 이 중 '15년 이후에 신·변종 및 국내 최초 보고 포함 약 100여종
- 최근 감자갈쪽바이로이드, 국화줄기괴저바이러스 등이 많은 경제 작물에 발생되어 작물 폐기 등 방제 조치로 인한 경제적 피해 지속 발생
 - 바이러스 발생시 국내 농가 피해는 물론, 국내 유입에 따른 분쟁 소지, 해당 농산물 수출 불가 및 수입·개방 압력 등의 문제 우려
 - 농작물 바이러스병은 매년 발생하고 있음을 고려하면 동물 바이러스 병에 의한 경제적 손실 보다 피해 수준이 더욱 심각
 - * 식량, 원예작물 등에 바이러스가 감염되어 연간 최소 1조원의 피해발생 (참고 1, 2) 수준이 더욱 심각
 - * 식량, 원예작물 등에 바이러스가 감염되어 연간 최소 1조원의 피해발생 (참고 1, 2)

<작물 바이러스·병해충 피해 사례>

 <p>건강 PSTVd 감염</p>		
<p>▶ 감자갈쪽병(PSTVd) * '08년 처음 발생, 국내 발생 피해액 100억원 규모('10년)</p>	<p>▶ 오이·녹반모자이크바이러스 * '96년 발생으로 상주 관내 보상액 100억원 이상</p>	<p>▶ 붉은곰팡이병 * 맥류, 옥수수, 벼 등 작물에 발생하는 심각한 병으로 수확의 30% 감소 피해</p>

* 출처 : 2017 농작물 병해충 예찰 발제보고서(농진청)

- 외래유입 해충의 경우 1900년 이후 47종의 해충이 유입되었으며, '00년 ~ '16년까지 총 14종이 유입되는 등 유입속도 증가추세
 - * 소나무재선충('88), 꽃매미('06), 선녀벌레('09), 갈색날개매미충('10), 각지벌레류('15), 동백순각지벌레/작은벌집딱정벌레('16) 등이 유입되어 21,000 ha 이상의 농업 재배지 및 산림생태계 피해 유발
- 주요 농업 해충 피해 현황 조사 결과 갈색날개매미충, 미국선녀벌레, 꽃매미의 발생 빈도 및

피해 규모는 점차 증가 추세

- 꽃매미의 경우 '09년부터 집중 방제로 포장발생 및 피해는 감소 추세였으나, '16년 전국적으로 83개 시·군에서 발생, 전년보다 피해면적 2.2배 증가
 - * 꽃매미의 포도 가해에 대한 직·간접 피해액은 246억~979억 원으로 추정 (2017 농작물 병해충 예찰 발제보고서(농진청))
- 고위험성 식물병해충 발생 증가에 따른 국가 간 무역(수출) 감소
 - 기후변화, 교역 확대 등으로 인해 외래 신규 병해충 유입 및 피해가 증가하고 있으며, 고위험 병해충 발생에 따른 검역 수요 및 국내 농산물 수출 감소에 지속적 영향을 미치고 있는 상황
 - 과수화상병 발생으로 사과 등에 대해 일본·호주는 수입금지조치, 대만은 무감염 증명서 발급 농산물에 대한 조건부 수입 조치 발령
- 또한, 국가간 교역 확대에 따라 검역수요가 지속적으로 증가하는 상황에서 작물 바이러스의 해외 유입가능성이 상존하는 상황
 - * (수입검역 건수) '00년 7,594천건 → '17년 9,917천건(30.6% 증가)
- 식량안보와 안전한 농산물 생산을 위해 작물보호 기술개발에 국가 주도의 지속적이며 체계적인 지원 필요
- 작물보호연구는 기초 학문으로 연구 성과가 서서히 나타나고 기본적으로 식량 안전 생산, 국민 먹거리 제공을 위해 국가 주도의 추진 필요
 - 국가별 바이러스 데이터베이스 구축 및 관련 연구가 활발하게 추진 중이며, 우리나라 또한 예방 및 관리를 위한 빅데이터 구축 필요
 - 현황조사, 진단, 방제, 바이러스 등 작물 바이러스의 예방 및 관리 전주기에 체계적인 기술개발을 추진하여 관리체계 구축 필요
- 작물 질병 문제는 농산업 생산성 제고를 위해 시급한 해결과제이나 이를 극복하기 위한 민간 역량이 부족하여 정부 주도의 지원 필요
 - 주요 작물병해충 확산으로 농산업 현장에 많은 피해를 주고 있으나 민간의 관련 대응 기술 역량 부족
- 작물바이러스 및 병해충 대응 기술 작물보호제 개발 등 관련 핵심기술 역량 확보로 관련 산업 활성화 및 농가소득 증대에 기여
- 현장진단용 등온유전자증폭 RPA 진단키트 개발을 위한 유전자 확보 및 간편 현장 진단용 기기를 이용한 진단시스템 개발
- 핵심소재 및 기술의 국산화로 진단키트 생산 비용 절감에 따른 저가의 진단키트 보급 확대
- 현장사용이 가능한 Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 분자 진단키트개발

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 주관연구기관- (주) 엘씨엠사이언스

- 국내외 작물별 식물바이러스 유전자 정보 확보
- 획득한 유전정보를 바탕으로 타겟 유전자들에 대한 인공 RNA합성
- 각 유전자원들의 RPA 진단용 후보 프라이머와 프로브들 제작
- 최적의 반응을 보이는 프라이머 프로브 세트 선별
- Real time PCR 머신과 T8 ISO UV scanner에 사용 가능한 정밀 진단을 위한 RPA real time detection kit 시제품 제작 (TwistDx, Exo liquid kit)
- Lateral flow detector를 이용한 RPA-LFD detection kit 시제품 제작 (TwistDx, nfo kit)
- 사이버그린을 이용한 end point 결과 분석용 RPA end point detection kit 시제품 제작 (TwistDx, Basic liquid kit)
- 인공 합성한 바이러스 RNA와 야외 식물바이러스들을 대상으로 한 진단검사 유용성 평가

2) 공동연구기관-강원대

- 진단 대상 식물바이러스 수집, 바이러스 핵산 분리 및 보관
- *In vitro* RNA, 온실 수준 및 농가포장시설에 대한 진단검사 및 유용성 평가
- RPA 바이러스 진단제의 진단 능력 평가 및 임상 시험을 위한 바이러스 확보
- Lateral flow detector를 이용한 RPA-LFD detection kit에 대한 민감도와 특이도 평가 시험

3) 위탁연구기관-전남대

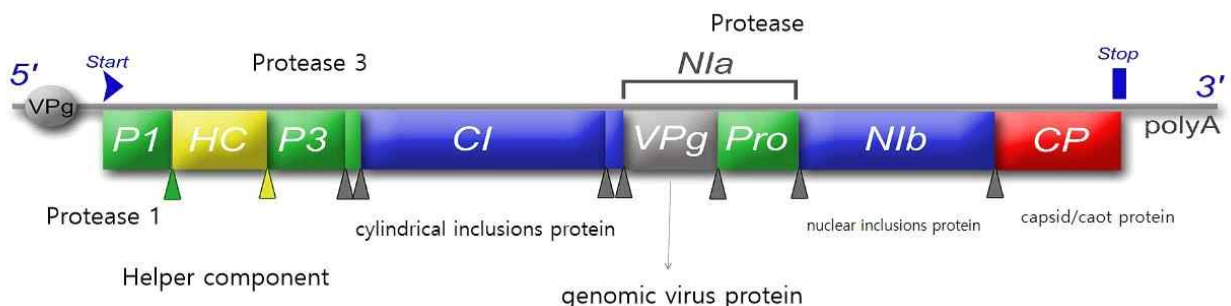
- 과수(감귤, 포도) 피해 바이러스 CTV, GFkV 국내외 분리주 염기서열 확보 및 분석
- CTV, GFkV 검출 특이적 Probe 제작 및 진단 테스트
- End point detection kit 개발

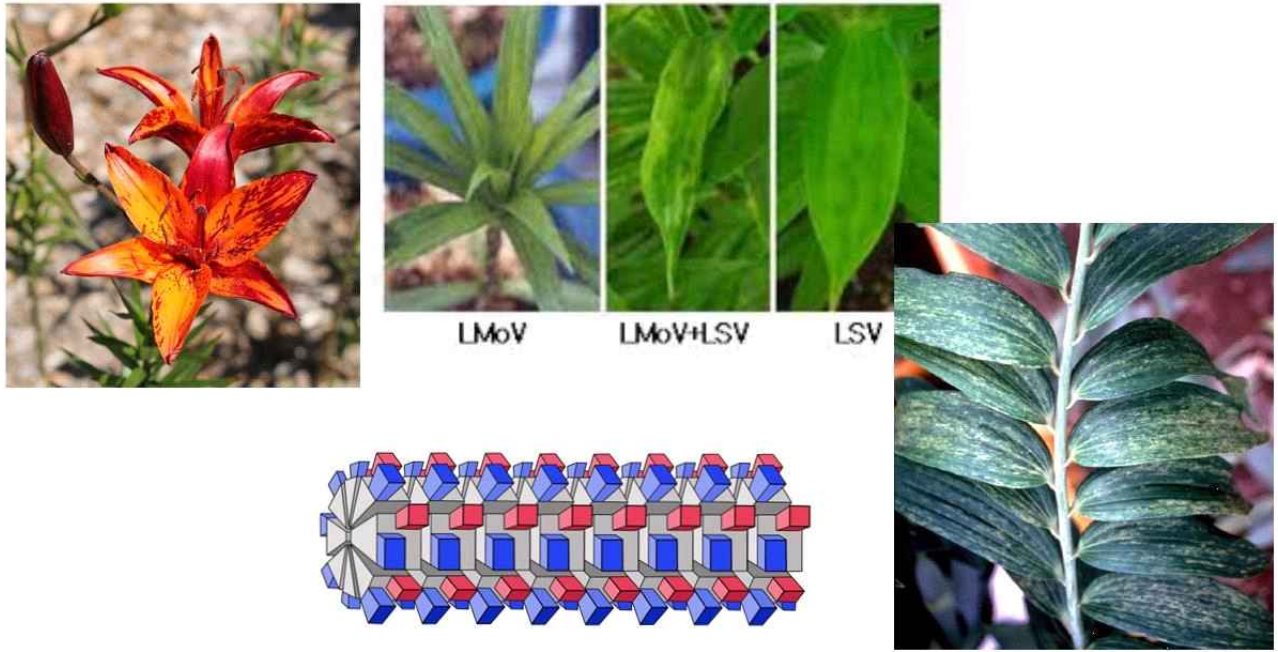
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 정성적 연구개발성과

■ 주관연구기관- (주) 엘씨엠사이언스 연구결과

1. Lily mottle virus (LMoV) - RPA probe 진단제 개발



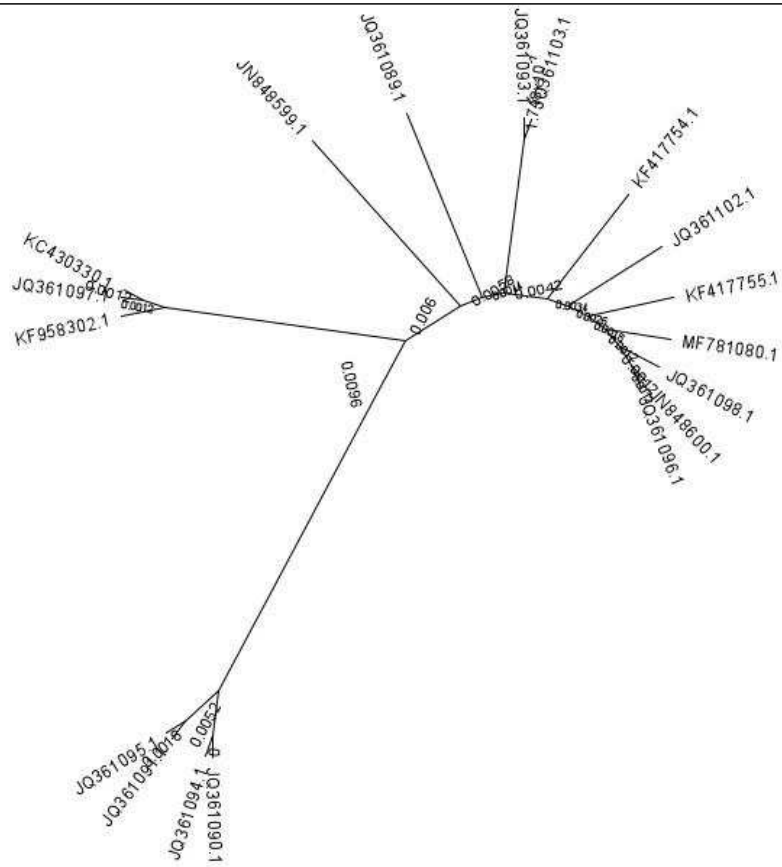


<그림 1-1> Genetic map and Symptom of Lily mottle virus (LMoV)
(https://en.wikipedia.org/wiki/Lily_mottle_virus).

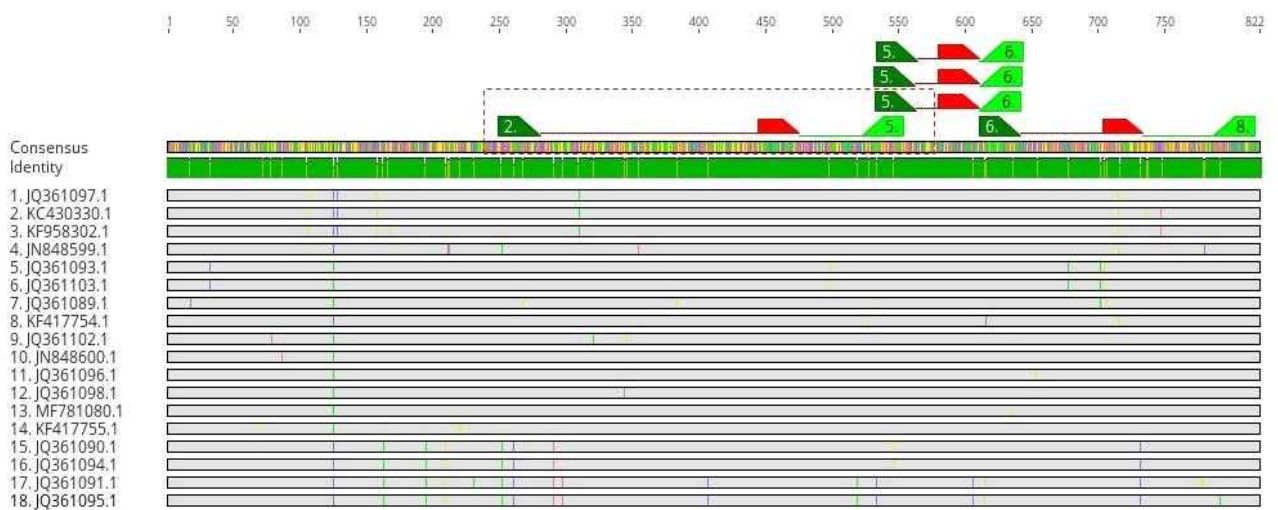
1) LMoV의 coat protein gene (18건)에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인

	JQ361097.1	KC430330.1	KF958302.1	JN848599.1	JQ361093.1	JQ361103.1	JQ361089.1	KF417754.1	JQ361102.1	JN848600.1	JQ361096.1	JQ361098.1	MF781080.1	KF417755.1	JQ361090.1	JQ361094.1	JQ361091.1	JQ361095.1
JQ361097.1		99.8%	99.8%	98.9%	98.7%	98.7%	98.7%	99.3%	98.9%	99.1%	99.1%	99.1%	99.1%	99.0%	98.4%	98.4%	97.6%	97.7%
KC430330.1	99.8%		99.8%	98.7%	98.4%	98.4%	98.4%	99.0%	98.7%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.8%	98.2%	98.2%	97.3%	97.4%
KF958302.1	99.8%	99.8%		98.7%	98.4%	98.4%	98.4%	99.0%	98.7%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.8%	98.2%	98.2%	97.3%	97.4%
JN848599.1	98.9%	98.7%	98.7%		98.5%	98.5%	98.5%	99.1%	98.8%	99.0%	99.0%	99.0%	98.9%	98.5%	98.5%	97.7%	97.8%	
JQ361093.1	98.7%	98.4%	98.4%	98.5%		100%	99.0%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%	98.3%	98.3%	97.4%	97.6%
JQ361103.1	98.7%	98.4%	98.4%	98.5%	100%		99.0%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%	98.3%	98.3%	97.4%	97.6%
JQ361089.1	98.7%	98.4%	98.4%	98.5%	99.0%	99.0%		98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.1%	98.3%	98.3%	97.4%	97.6%
KF417754.1	99.3%	99.0%	99.0%	99.1%	98.9%	98.9%	98.9%		99.1%	99.4%	99.4%	99.4%	99.4%	99.3%	98.7%	98.7%	97.8%	97.9%
JQ361102.1	98.9%	98.7%	98.7%	98.8%	99.0%	99.0%	99.0%	99.1%		99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.4%	98.5%	98.5%	97.7%	97.8%
JN848600.1	99.1%	98.9%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.4%	99.5%		99.8%	99.8%	99.8%	99.6%	98.8%	98.8%	97.9%	98.1%
JQ361096.1	99.1%	98.9%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.4%	99.5%	99.8%		99.8%	99.8%	99.6%	98.8%	98.8%	97.9%	98.1%
JQ361098.1	99.1%	98.9%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.4%	99.5%	99.8%	99.8%		99.8%	99.6%	98.8%	98.8%	97.9%	98.1%
MF781080.1	99.1%	98.9%	98.9%	99.0%	99.3%	99.3%	99.3%	99.4%	99.5%	99.8%	99.8%	99.8%		99.6%	98.8%	98.8%	97.9%	98.1%
KF417755.1	99.0%	98.8%	98.8%	98.9%	99.1%	99.1%	99.1%	99.3%	99.4%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%		98.7%	98.7%	97.8%	97.9%
JQ361090.1	98.4%	98.2%	98.2%	98.5%	98.3%	98.3%	98.3%	98.7%	98.5%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.7%		100%	98.9%	99.0%
JQ361094.1	98.4%	98.2%	98.2%	98.5%	98.3%	98.3%	98.3%	98.7%	98.5%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.7%	100%		98.9%	99.0%
JQ361091.1	97.6%	97.3%	97.3%	97.7%	97.4%	97.4%	97.4%	97.8%	97.7%	97.9%	97.9%	97.9%	97.9%	97.8%	98.9%	98.9%		99.6%
JQ361095.1	97.7%	97.4%	97.4%	97.8%	97.6%	97.6%	97.6%	97.9%	97.8%	98.1%	98.1%	98.1%	98.1%	97.9%	99.0%	99.0%	99.6%	

<그림 1-2> Comparison the homology of 18 cases of LMoV-CP genes.



<그림 1-3> Phylogenic tree of 18 cases of LMov-CP genes.



<그림 1-4> Region of primer and probe of LMov-CP genes.

LMoV2 - Primer and Probe

1. LMoV2-250 F:

5'-GACCAXXXAGATATTXXXAAATACAAGGTCAA-3'

2. LMoV2-445P:

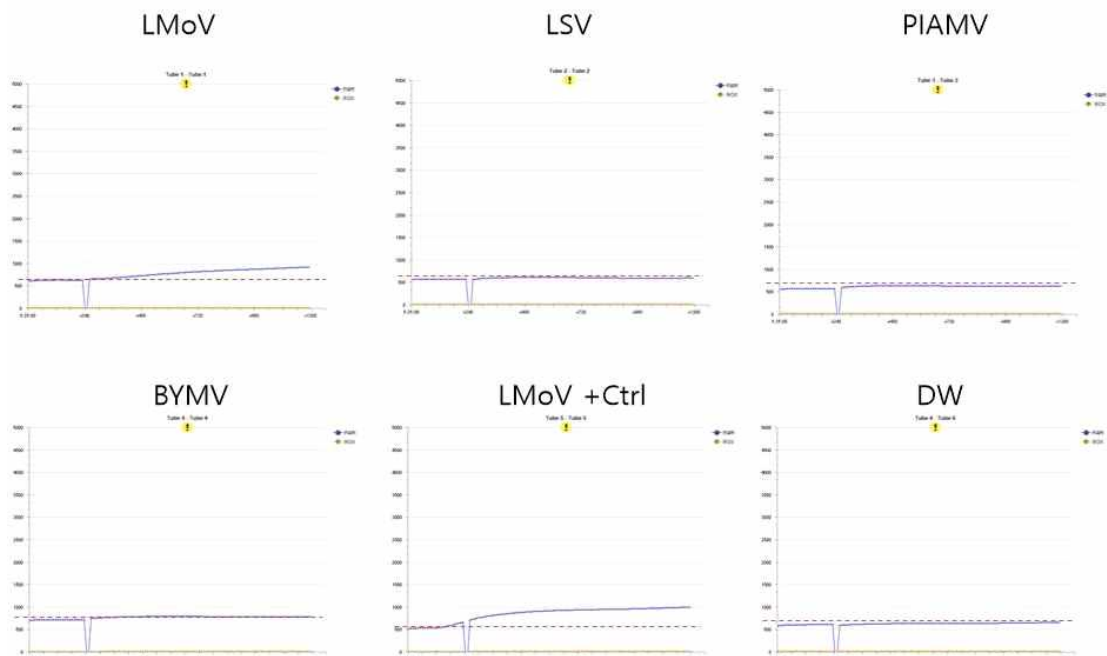
5'-AGATCXXXAAGTTGXXXTCCTTTACGTCC[FAM-dT]A[THF]AC
[BHQ1-dT]TGAAXXXXXAAAACC-3'Spacer C

3. LMoV2-553R:

5'-CTAAATTXXXGCTTCTCAXXTAAGCTTCAGC-3'

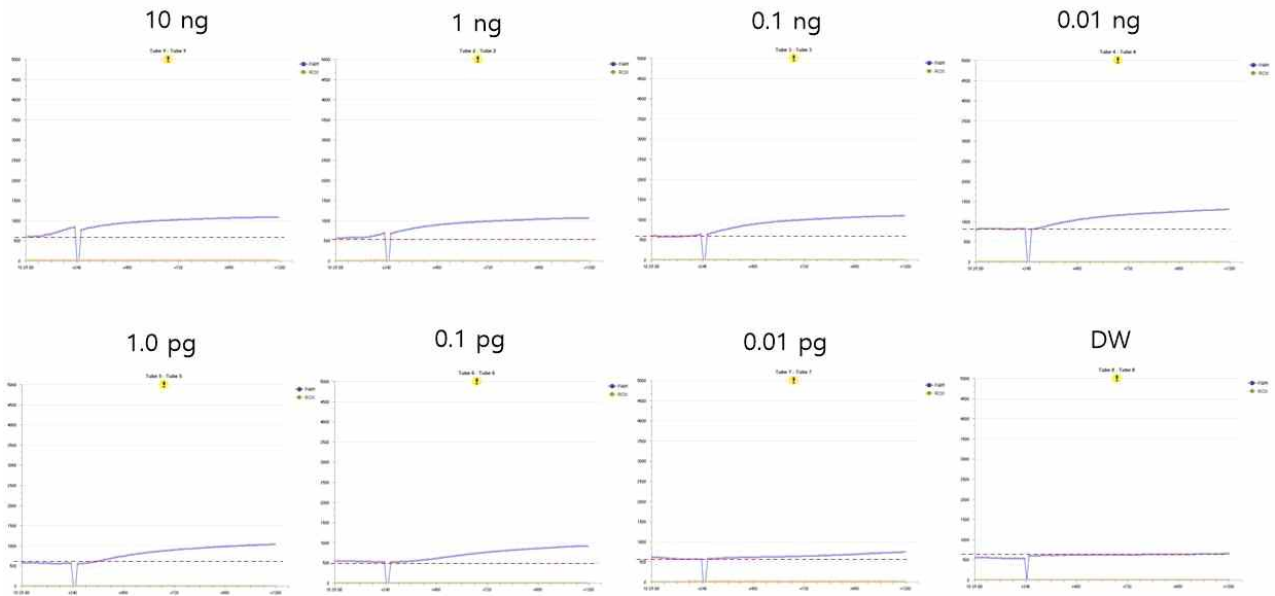
<그림 1-5> Candidate of primer and probe set of LMoV2-CP genes.

- LMoV isolates 18건에 대한 유전자를 분석한 결과, 3개의 그룹으로 나뉘었다 (그림 1-2, 3).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3' 쪽으로 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되었고, 중앙에 하나의 프라이머 프로브 세트 (빨간색 점선 박스)가 생성되어 이를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; LMoV2-250F, LMoV2-445P, LMoV2-553R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-4, 5).
- RPA Exo kit를 사용하여 다른 3종의 가지의 관련 바이러스들, Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차 반응을 조사한 결과, LMoV에만 잘 반응하였다 (그림 1-6).
- Exo RT RPA 반응은 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수 와는 반응이 없었다 (그림 1-6).



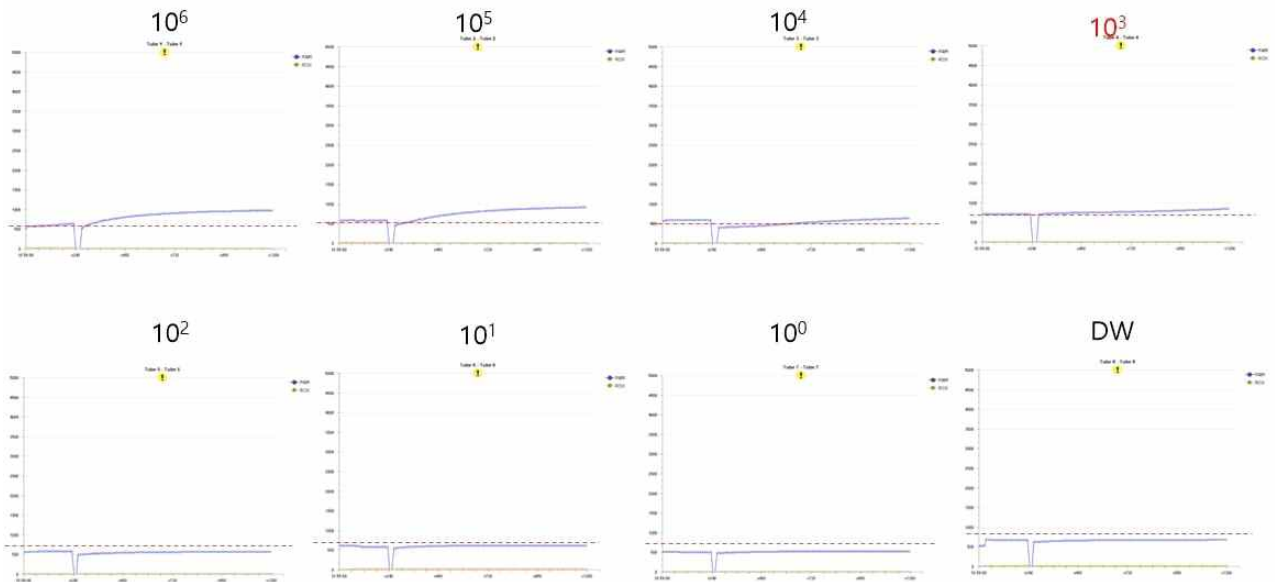
<그림 1-6> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of LMoV with several viruses.

○ 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-7).



<그림 1-7> LoD (ng/ul) of RT-RPA reaction with LMoV primer and probe set.

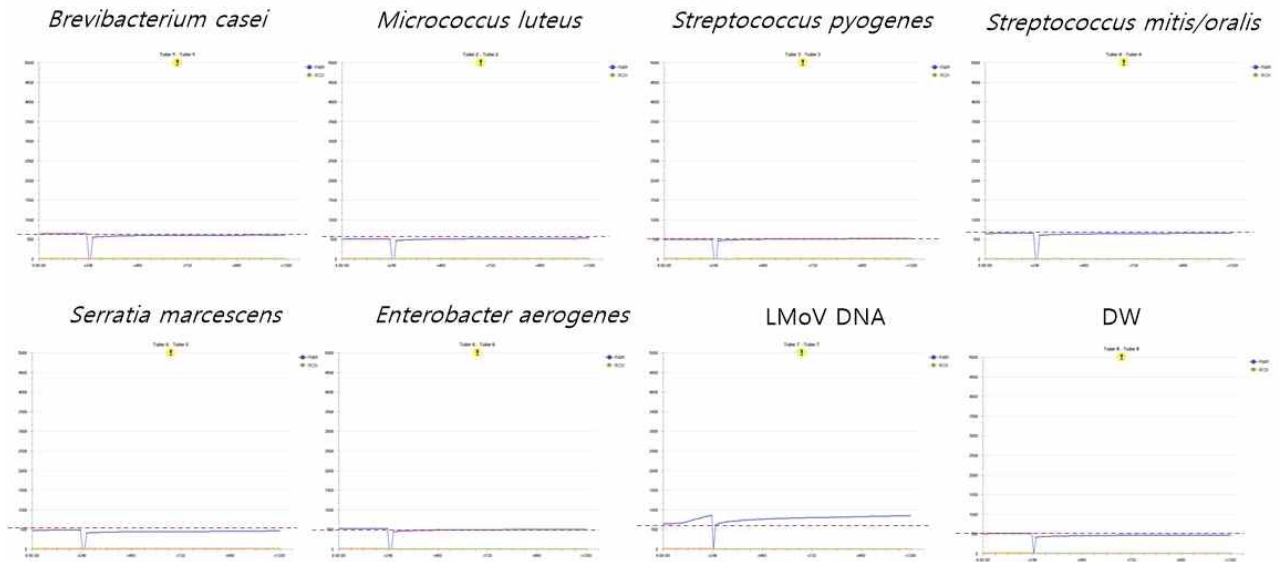
○ 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1000 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-8).

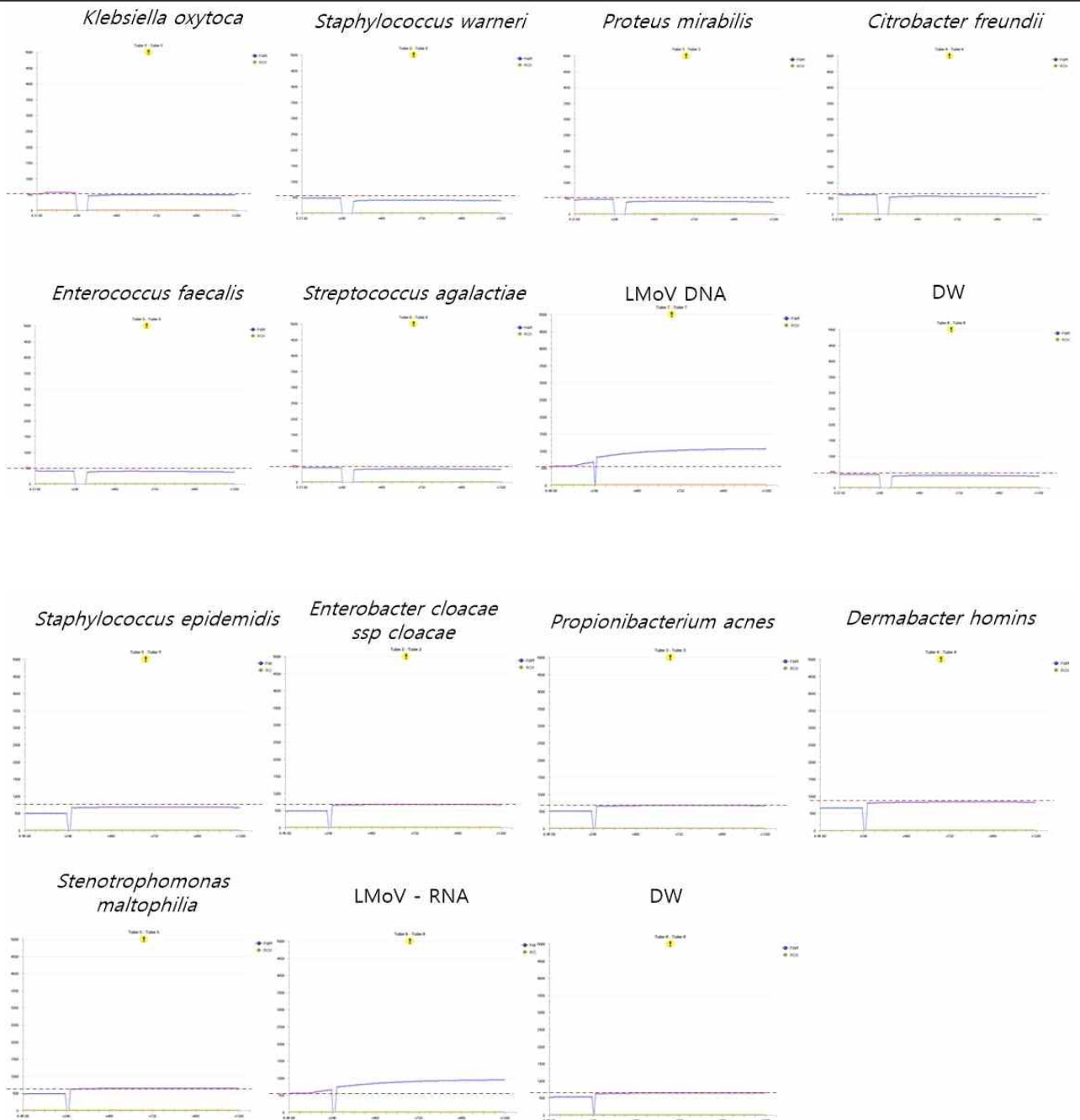


<그림 1-8> LoD (copies/ul) of RT-RPA reaction with LMoV primer and probe set.

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2-553R	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2-445P 1pM	0.2 ul	2.4 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	9.6 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	LMoV - mRNA transcript	Positive





<그림 1-9> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of LMoV with several bacteria.

- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 LMoV2 primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-9).
- 이상의 결과로 RT-RPA LMoV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-10, 11).
- 엘씨엠싸이언스의 홈페이지에 올려서 시판을 시작하였다 (그림 1-12).



<그림 1-10> LMoV ER Detection kit.

Revision No.: LCM-LMoV-ER-0001
 Issue Date: Aug 08, 2023
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggi-do South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 spcegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Lily mottle virus (LMoV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of LMoV coat protein gene to detect the LMoV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Most lilies are grown by vegetative propagation, bulbs may be infected with viruses and consequently transmit from one generation to the next. Moreover, there are more than 10 different viruses that cause lily crops of quality and quantity damage throughout the world. The Lily mottle virus (LMoV; genus Potyvirus, family Potyviridae), being widespread throughout China, is a non-enveloped, rod-shaped flexuous virus with a width of 11 to 15 nm and a length of 680 to 900 nm. LMoV infection is characterized by deformity, curling, mottling and necrotic of leaves along with necrotic spotting and deformation of flowers. LMoV-infected plants co-infected with Lily symptomless virus (LSV) may also show plant stunting as well as more severe foliar symptoms. LMoV can be transmitted through vegetative propagation, mechanically from plant to plant or by aphids.

The Lily mottle virus (LMoV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Lily mottle virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the LMoV coat protein gene for the unique amplification of Lily mottle virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	LMoV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	LMoV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	LMoV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	LMoV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	LMoV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	LMoV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	LMoV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
* It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

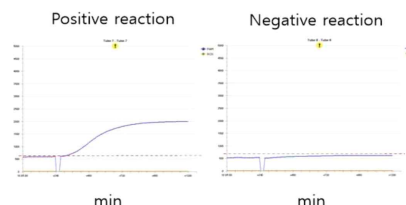
Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
* Unknown: clinical sample
* Negative control
* Positive control

8. Reading the Result

Exp. example



<Example of LMoV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	LMoV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	LMoV Positive
2	+	-	-	LMoV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

Lily mottle Virus (LMoV) ER-Detection Kit

Lily mottle Virus (LMoV) ER-Detection Kit



₩ 600,000

Lily Mottle Virus (LSV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 LMoV를 검출하는 분자진단제입니다.

+ 1 -

600,000원

바로구매

장바구니

Lily Mottle Virus (LMoV) ER-Detection Kit

Research use only

제품스펙

주문정보

관련제품

사용목적

Lily Mottle Virus (LSV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 LMoV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공

제품스펙

검체	LMoV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
민감도	10 ³ copies/ul
특이도	100%
보관온도	-20°C

주문정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-LMoV-ER-50	Lily Mottle Virus (LSV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

<그림 1-12> LMoV ER Detection kit in LCM science Homepage.

■ LMoV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. LMoV2nfo-250F:

5'-GACCXXXXXCAGATATTTXXXATACAAGGTCAA -3'

2. LMoV2nfo-445P:

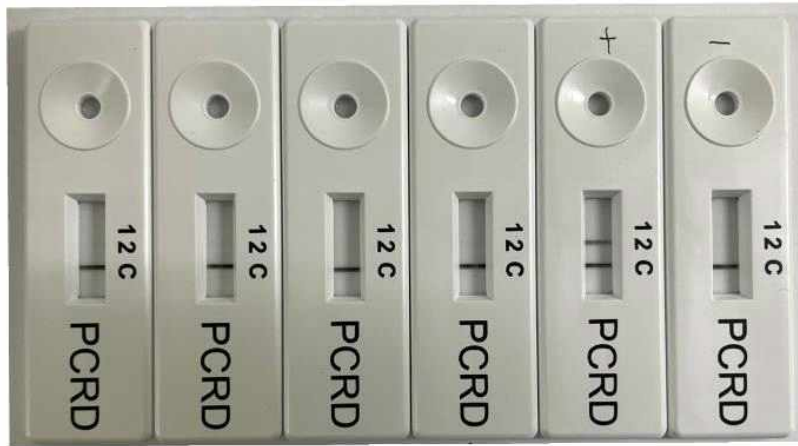
5'- [FAM]AGA TCA GCA XXX TGA ATT XXX TTT ACG TCC TA[THF]ACT XXX ACA CGC AAA ACC -C3 Spacer

3. LMoV2-553R:

5'- [Biotin] CTAAAXXTTCTCAATATXXXGCTTCAGC -3'

<그림 1-13> RT-RPA nfo primer probe set of LMoV.

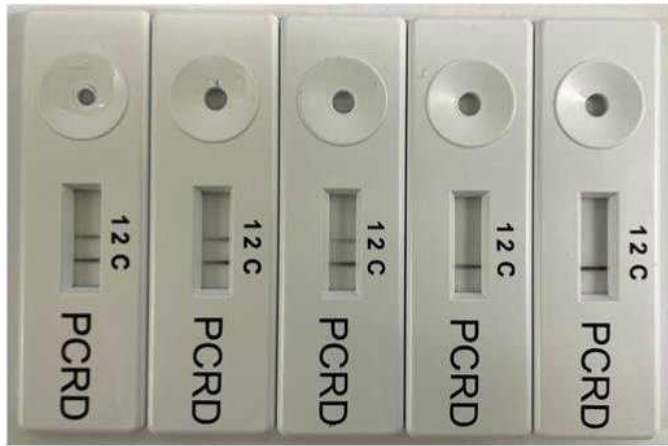
- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT LMoV primer & probe set를 응용하여 PCRD를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-13).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-14).
- 4가지의 관련바이러스중에서 LMoV와만 반응을 하였다 (그림 1-14).
- 검출한계는 0.1 pg, 1000 copies/ul 까지 가능하였다 (그림 1-15, 16).



virus	LMoV	LSV+P IAMV	PIAMV +LSV	BYMV	+CTRL	DW
result	+w	-	-	-	+	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2nfo-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-553R	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-445P 1pM	0.2 ul	2.4 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	9.6 ul
Total	20 ul	

<그림 1-14> RT-RPA nfo reaction with LMoV primer and probe set.



LoD	0.01 ng	1 pg	0.1 pg	0.01 pg	DW
Result	+	+	+	-	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2nfo-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-553R	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-445P 1pM	0.2 ul	2.4 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	9.6 ul
Total	20 ul	

<그림 1-15> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with LMoV primer and probe set.

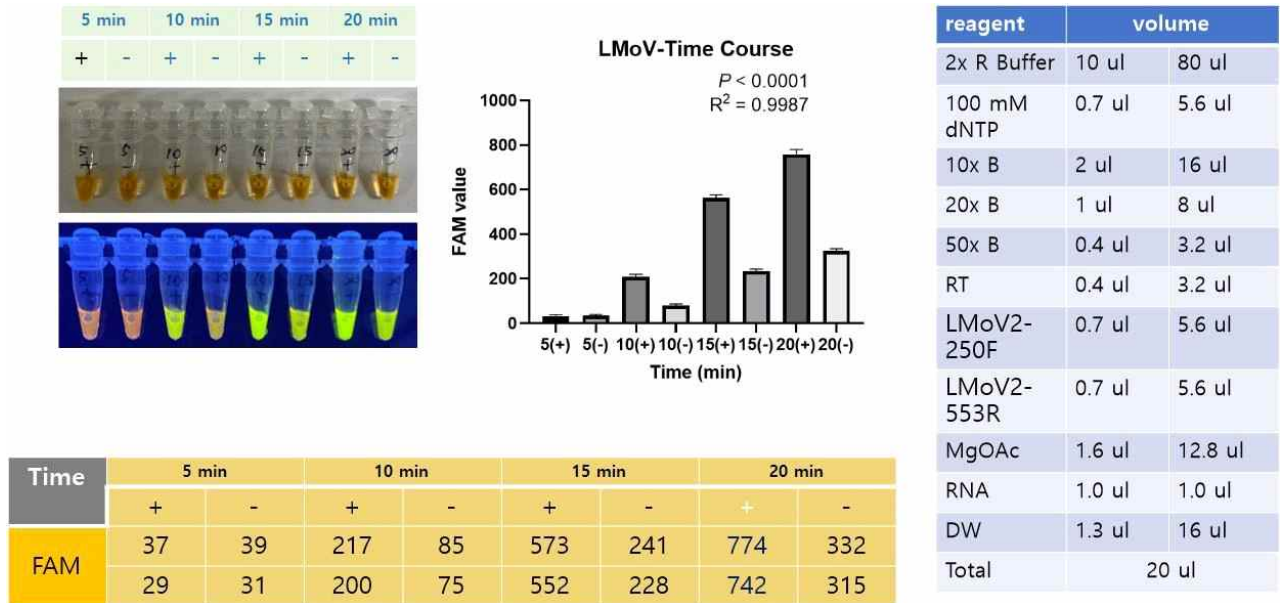


LoD	10 ⁶	10 ³	10 ²	10 ¹	DW
Result	+	+	-	-	-

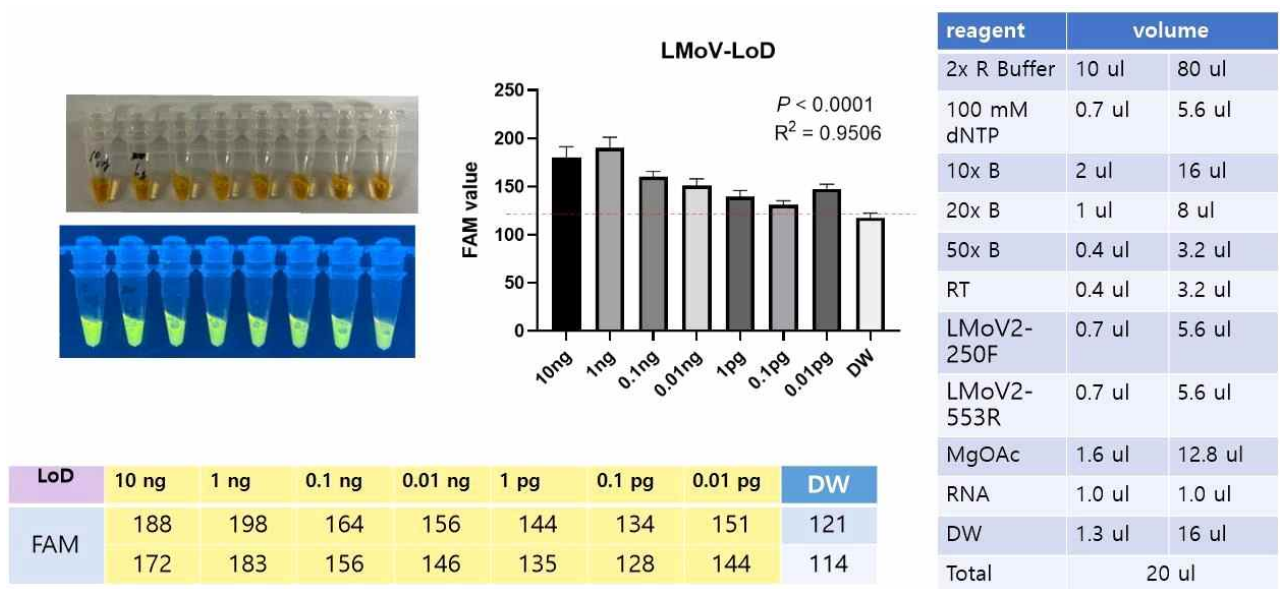
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2nfo-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-553R	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2nfo-445P 1pM	0.2 ul	2.4 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	9.6 ul
Total	20 ul	

<그림 1-16> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with LMoV primer and probe set.

■ LMoV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



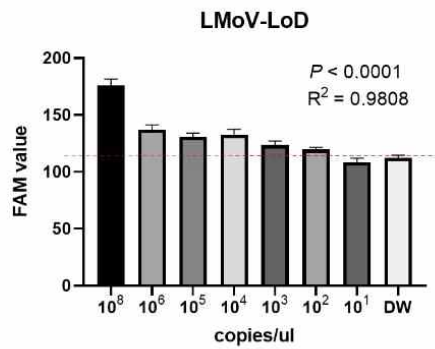
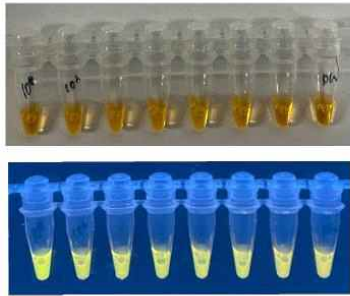
<그림 1-17> LMoV RT-RPA end point detection kit according to the reaction time.



<그림 1-18> Limitation of detection (LoD, ng/ul) LMoV RT-RPA end point detection kit.

- 사이버그린을 이용한 LMoV end point detection kit는 반응 후 10분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-17).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 0.01 ng까지 검출이 되었다 (그림 1-18).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-19).

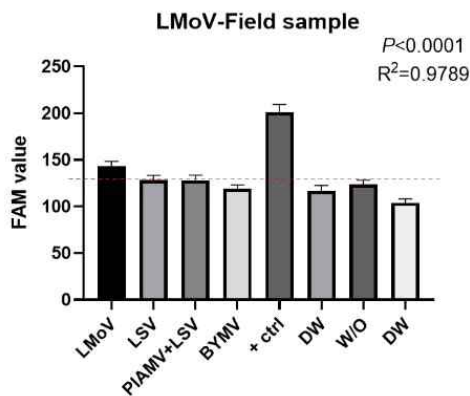
○ 4가지 관련바이러스 (Lily symptomless virus, Bean yellow mosaic virus, Plantago asiatica mosaic virus)와 RPA 반응을 시켜본 결과 LMoV와만 잘 반응하였다 (그림 1-20).



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2-553R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	180	140	133	136	126	121	111	114
	172	134	128	129	121	118	106	111

<그림 1-19> Limitation of detection (LoD, ng/ul) LMoV RT-RPA end point detection kit.



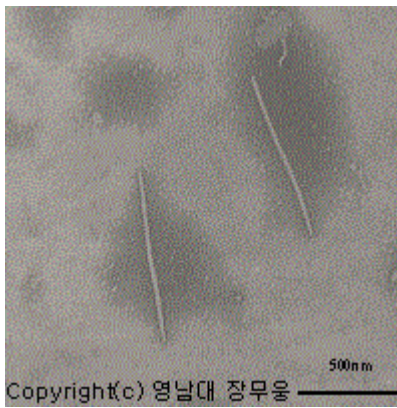
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LMoV2-250F	0.7 ul	5.6 ul
LMoV2-553R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

	LMoV	LSV	PIAMV V+LSV	BYMV	+CTRL	DW	W/O	DW
FAM	147	132	132	122	207	121	121	107
	140	125	124	116	195	113	127	101

<그림 1-20> RPA reaction of LMoV RT-RPA end point detection kit with several viruses.

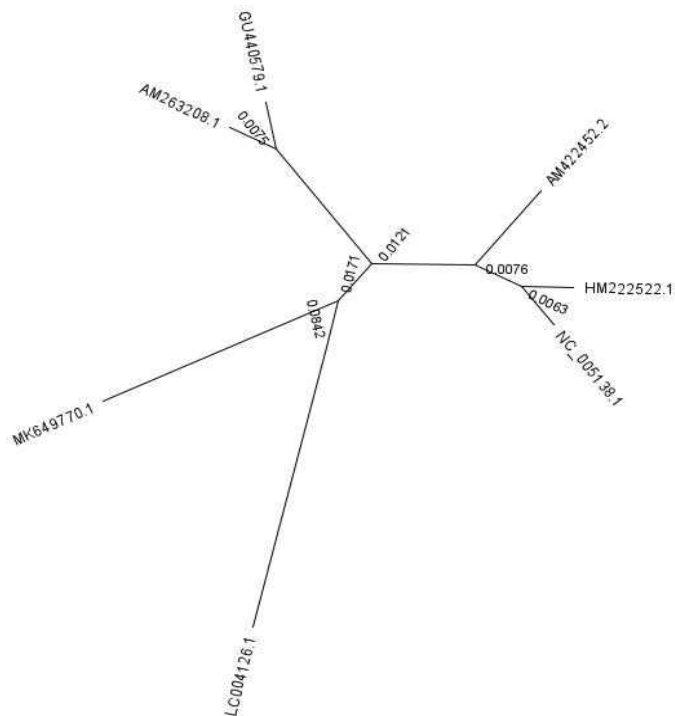
2. Lily symptomless virus (LSV) - RPA probe 진단제 개발

LSV는 길이 640nm, 직경 17-18nm의 사상 바이러스 입자를 포함합니다. LSV의 게놈 RNA는 8,394 개의 뉴클레오티드(폴리(A) 테일 제외)로 구성되어 있으며 Mr 220 kDa(1,948 aa), 25 kDa(228 aa), 12 kDa(106 aa), 7 kDa(64 aa), 32 kDa(291 aa) 및 16 kDa(140 aa)는 각각 5'에서 3' 말단에서 단일 가닥, 단일 가닥 및 센스 RNA 분자로 구성됩니다. ORF5(7140-8015nts)는 291aa의 CP를 암호화하고 LSV의 게놈 RNA는 32kDa의 Mr을 갖는 단일 유형의 CP에 의해 캡슐화됩니다. carlavirus 그룹의 3' 말단은 폴리(A) 테일과 연결되어 있습니다.

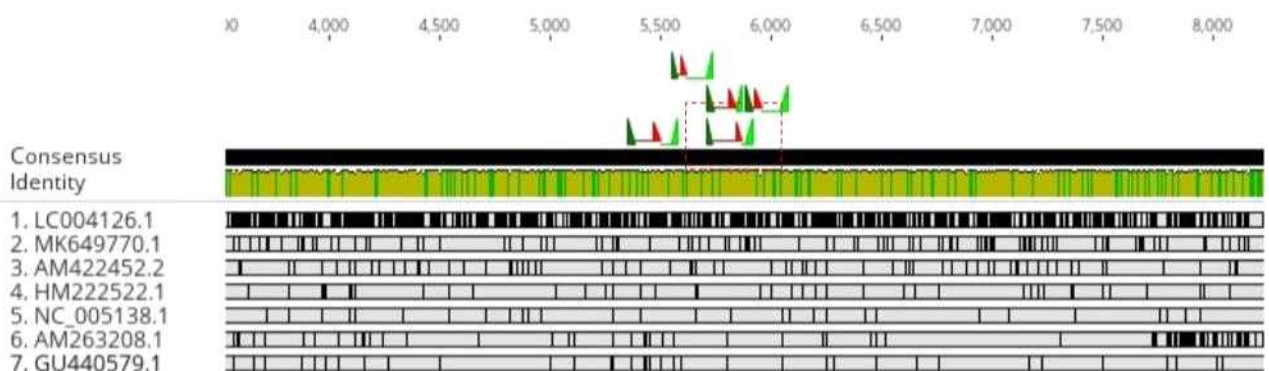


	LC004126.1	MK649770.1	AM422452.2	HM222522.1	NC_005138.1	AM263208.1	GU440579.1
LC004126.1		84.6%	85.1%	85.2%	85.2%	85.7%	85.2%
MK649770.1	84.6%		96.7%	96.9%	97.0%	96.0%	96.7%
AM422452.2	85.1%	96.7%		98.5%	98.5%	96.9%	97.8%
HM222522.1	85.2%	96.9%	98.5%		98.8%	97.2%	98.1%
NC_005138.1	85.2%	97.0%	98.5%	98.8%		97.4%	98.4%
AM263208.1	85.7%	96.0%	96.9%	97.2%	97.4%		98.5%
GU440579.1	85.2%	96.7%	97.8%	98.1%	98.4%	98.5%	

<그림 1-21> Homology distance of 6 cases of LSV isolates.



<그림 1-22> Phylogenic tree of 7 cases of LSV isolates.



<그림 1-23> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 6 cases of LSV isolates.

1. LSV-5,706 F :

5'- AGAAXXXXXAACAACCTAGTXXXTTGCATAGAT -3'

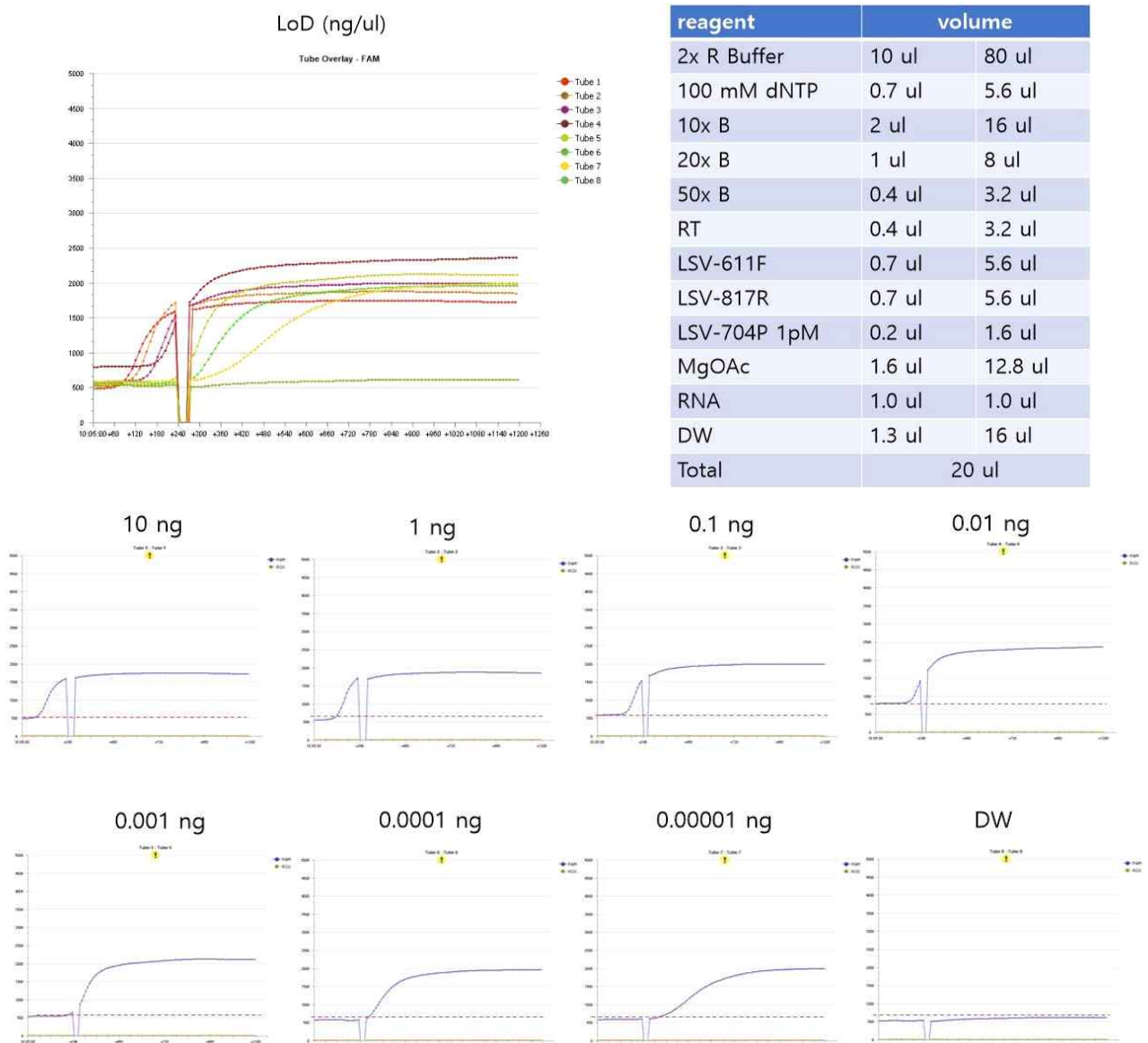
2. LSV-5,839 P:

5'- TTG XXX XXX TAT AAT TGT CAA AAA TAA GCA [FAM-dT] C [THF]
G [BHQ1-dT] TGA XXX CAG XXX TGC -3' Spacer C

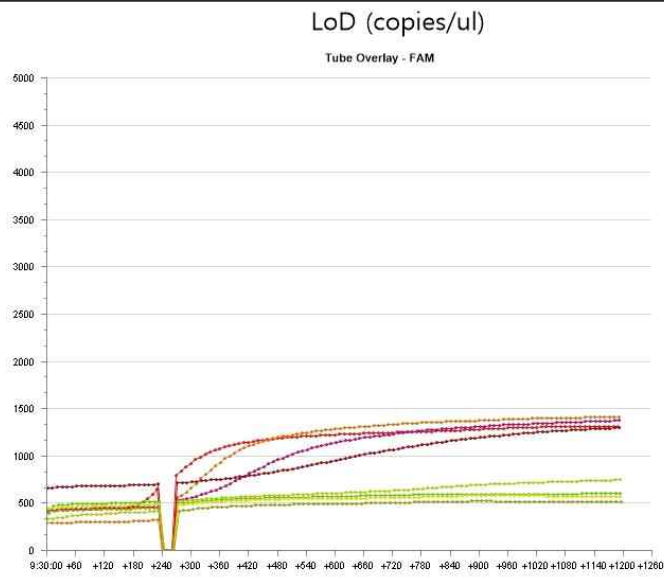
3. LSV-5,913 R :

5'- CCTAXXTTCTAATCTXXXTGTTCTCCTXXXTAC -3'

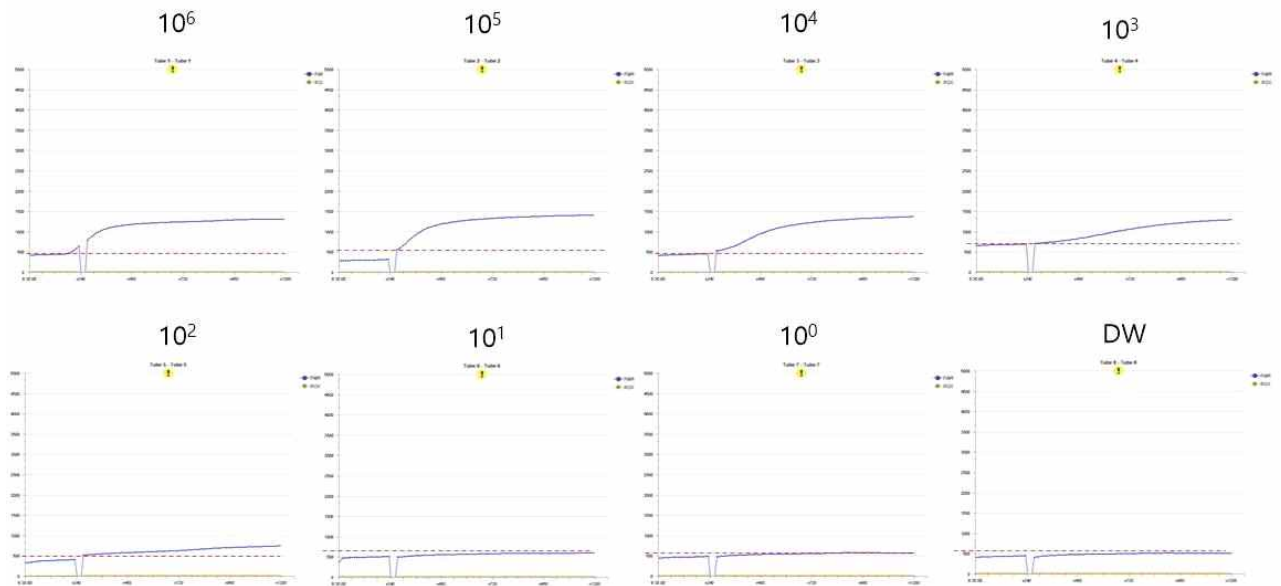
<그림 1-24> RPA exo primer and probe set of 7 cases of LSV isolates.



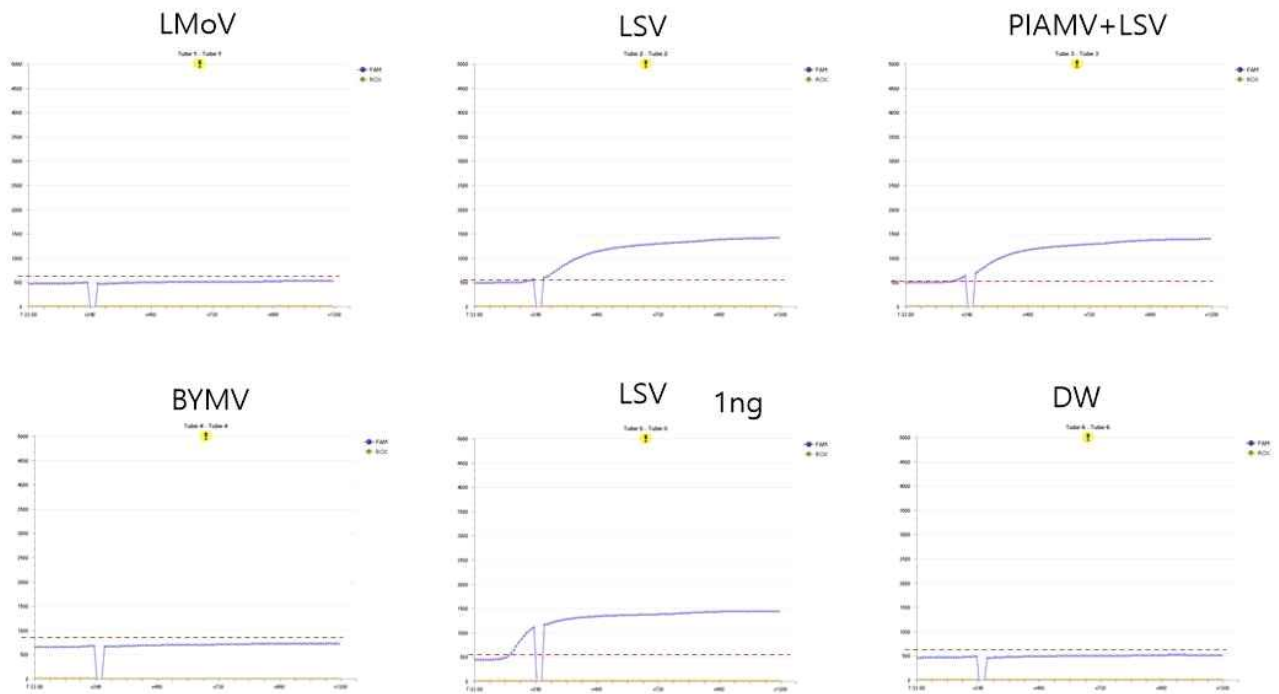
<그림 1-25> Limitation of Detection (ng/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of LSV.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSV-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSV-817R	0.7 ul	5.6 ul
LSV-704P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	



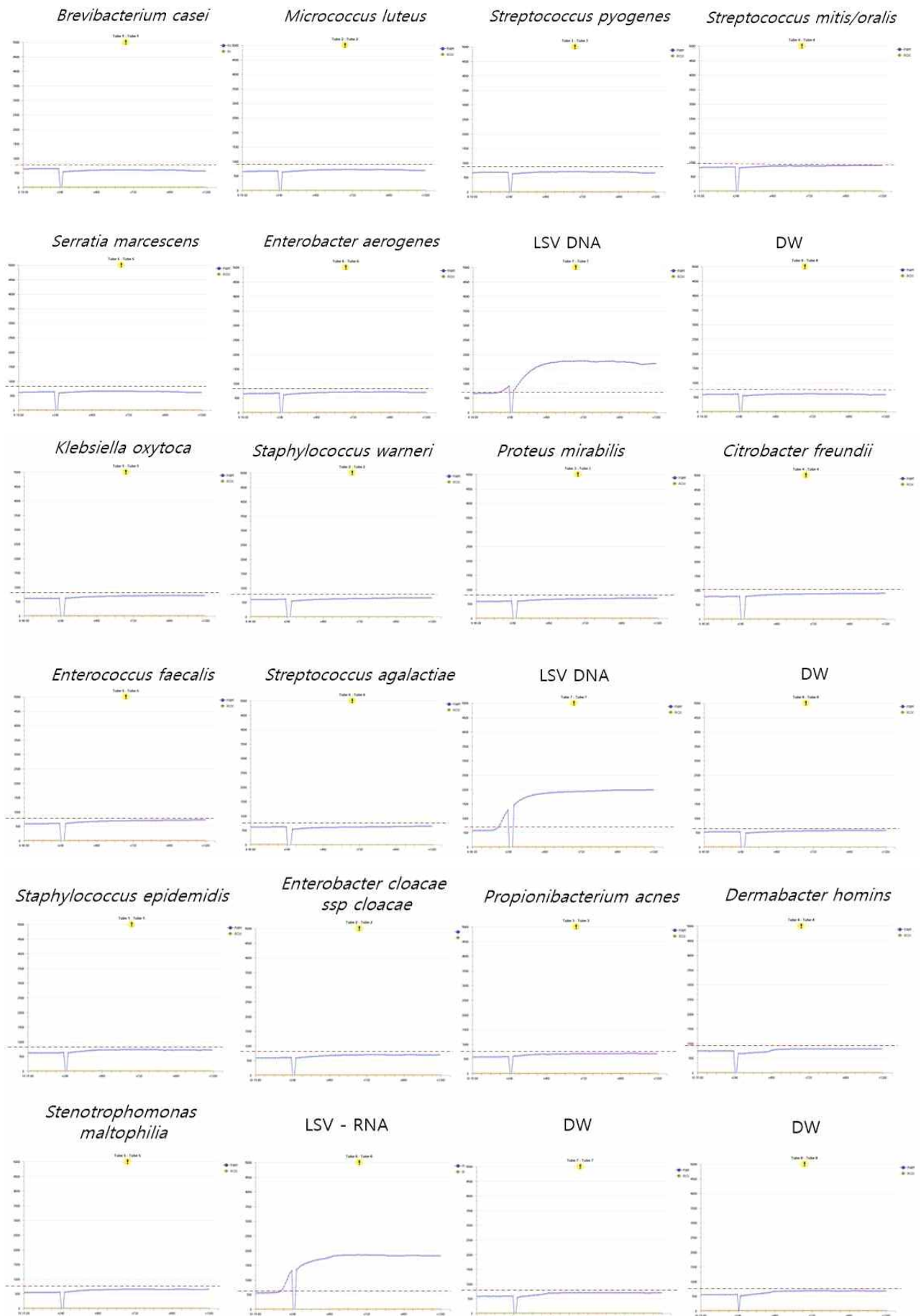
<그림 1-26> Limitation of Detection (copies/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of LSV.



<그림 1-27> RT-RPA exo reaction of LSV primer and probe set with several viruses.

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSV-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSV-817R	0.7 ul	5.6 ul
LSV-704P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp. cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	LSV - mRNA transcript	Positive



<그림 1-28> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of LSV with several bacteria.

- LSV isolates 7건에 대한 유전자를 분석한 결과, 분리주간 동질성이 85% 이상인 것으로 관찰되었으나, LC004126.1번이주를 제외하면 분리주간 동질성은 96% 이상이었다 (그림 1-21, 22).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3' 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; LSV-5706F, LSV-5839P, LSV-5913R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-23, 24).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-25).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-26).
- RPA Exo kit를 사용하여 다른 3종의 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, LSV에만 잘 반응하였다 (그림 1-27).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-27).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 LSV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림 1-28).
- 이상의 결과를 바탕으로 RT-RPA LSV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-29, 30).
- 엘씨엠싸이언스 홈페이지에 등록하여 시판을 실시하였다 (그림 1-31).



<그림 1-29> LSV ER detection kit.

Revision No.: LCM-LSV-ER-0001
 Issue Date: Jul 07, 2023
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Backto-ri Hyangnam-eup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Lily symptomless virus (LSV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of LSV gene to detect the LSV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Lanzhou lily (*L. davidii* Duch.var) is an important bulb edible crop which mostly distributes in middle area of Gansu province in China. Virus infection caused serious reduction in production of Lanzhou lily and other economic crops in recent years. Lily symptomless virus (LSV; family, Genus Carlavirus, species) is the most prevalent virus infecting Lanzhou lily, and it has been reported in USA, Europe, Australia and Asia. It is also one of the most harmful viruses of lilies that causes severe losses in terms of quantity as well as quality of bulb and flower production. The host range of LSV is mostly distributed in genus Lilium, however, in one case reported in *Alstroemeria*. The observed abnormalities such as growth reduction, smaller flowers and lower bulb yield can be caused by combined infection with LSV and cucumber mosaic virus (CMV) which threatens the yield and commercial production of lily plants.

LSV contains a filamentous viral particle, 640 nm in length and 17-18 nm in diameter. The genomic RNA of LSV is constituted of 8,394 nucleotides (excluding the poly (A) tail) and contains six open reading frames (ORFs) coding for proteins of Mr 220 kDa (1,948 aa), 25 kDa (228 aa), 12 kDa (106 aa), 7 kDa (64 aa), 32 kDa (291 aa) and 16 kDa (140 aa) from the 5' to 3' end respectively, composed of monopartite, single-stranded, plus sense RNA molecules. The ORF5 (7140-8015 nts) encodes a CP of 291 aa and genomic RNA of LSV is encapsidated by the single type of CP with a Mr of 32 kDa. The 3' terminal of carlavirus group is linked with a poly (A) tail.

The Lily symptomless virus (LSV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Lily symptomless virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the LSV gene for the unique amplification of Lily symptomless virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	LSV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	LSV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	LSV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	LSV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
 Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	LSV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	LSV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	LSV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - * It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

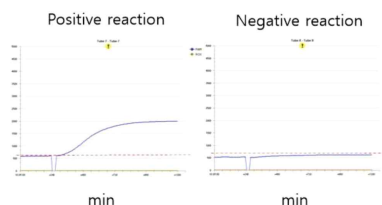
Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - * Unknown: clinical sample
 - * Negative control
 - * Positive control

8. Reading the Result

Exp. example



<Example of LSV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	LSV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	LSV Positive
2	+	-	-	LSV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.



Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit

Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit

₩ 600,000

Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd. 에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 LSV를 검출하는 분자진단제입니다.

+ 1 -

600,000원

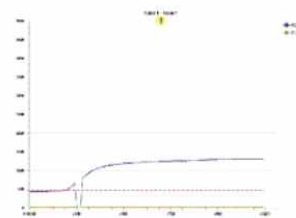
바로구매

장바구니

Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit

Research use only

Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit는 감염된 작물로 부터 LSV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.



제품스펙

주문정보

관련제품

사용목적

Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 LSV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공

[Electric Vehicle](#)[LCM SCIENCE](#)[LCM Energy Solution Inc](#)[FDA technology](#)[products](#)[community](#)**제품스펙**

검체	LSV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
민감도	10 ² copies/ul
특이도	100%
보관온도	-20°C

주문정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-LSV-ER-50	Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

<그림 1-31> LSV ER Detection kit in LCM science Homepage.

■ LSV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. LSVnfo-5,706 F :

5'- AGAAXXXACAACCTAGTXXXXTGCATAGAT -3'

2. LSVnfo-5,839 P:

5'- [FAM] TTG XXX XXX TAT AAT TGT CAA AAA TAA GCA C [THF]
G TGA AAT CAG XXX -3' Spacer C

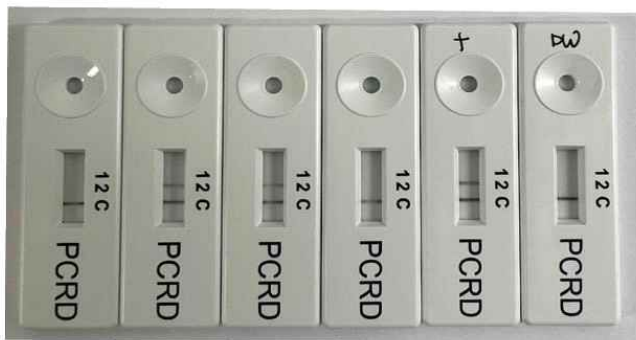
3. LSVnfo-5,913 R :

5'- [Biotin] CCTAXXXCTAATCTAAXXXTCCTCATAAC -3'

<그림 1-32> RT-RPA nfo primer probe set of LSV.

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT LSV primer & probe set를 응용하여 PCR-D을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-32).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분간 반응시킨 후 PCR-D 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- RPA nfo kit를 사용하여 다른 3종의 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, LSV가 혼합감염된 실험군에만 잘 반응하였다 (그림 1-33).
- 검출한계는 0.1 pg, 100 copies/ul 까지 가능하였다 (그림 1-34, 35).

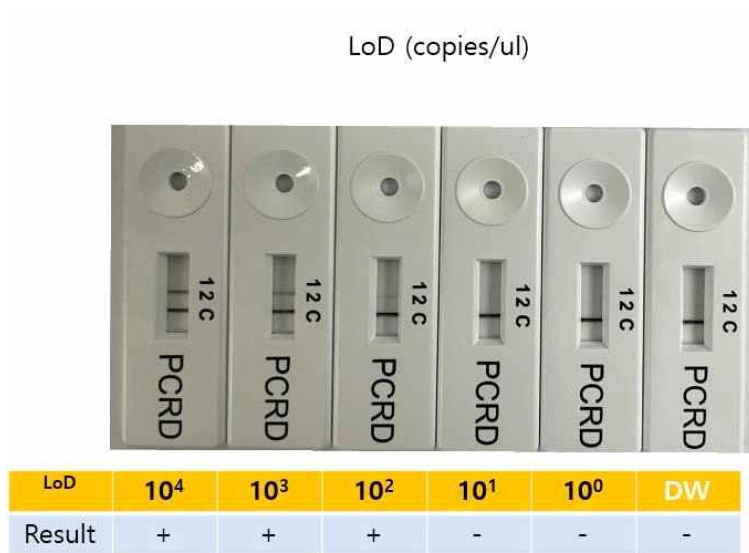
종 특이도



virus	LMoV	LSV+P IAMV	PIAMV +LSV	BYMV	+CTRL	DW
result	-	+	+	-	+	-

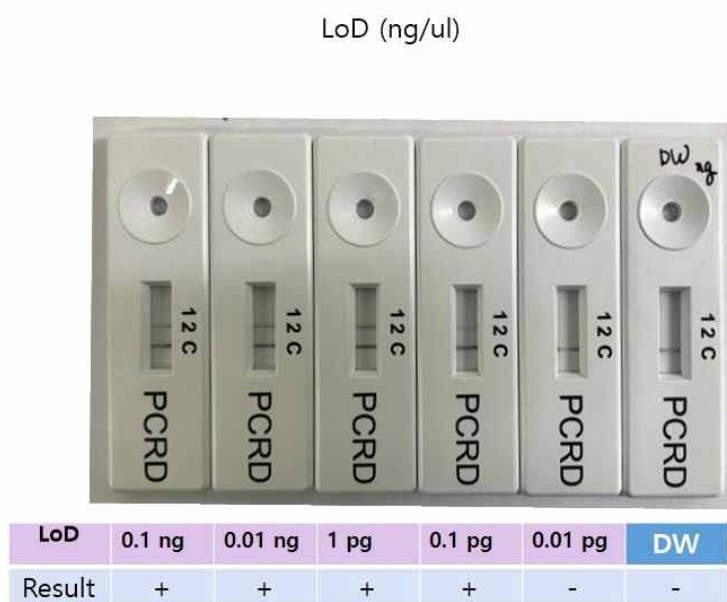
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSVnfo-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-817R	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-704P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-33> RT-RPA nfo reaction of LSV primer and probe set with several viruses.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSVnfo-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-817R	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-704P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

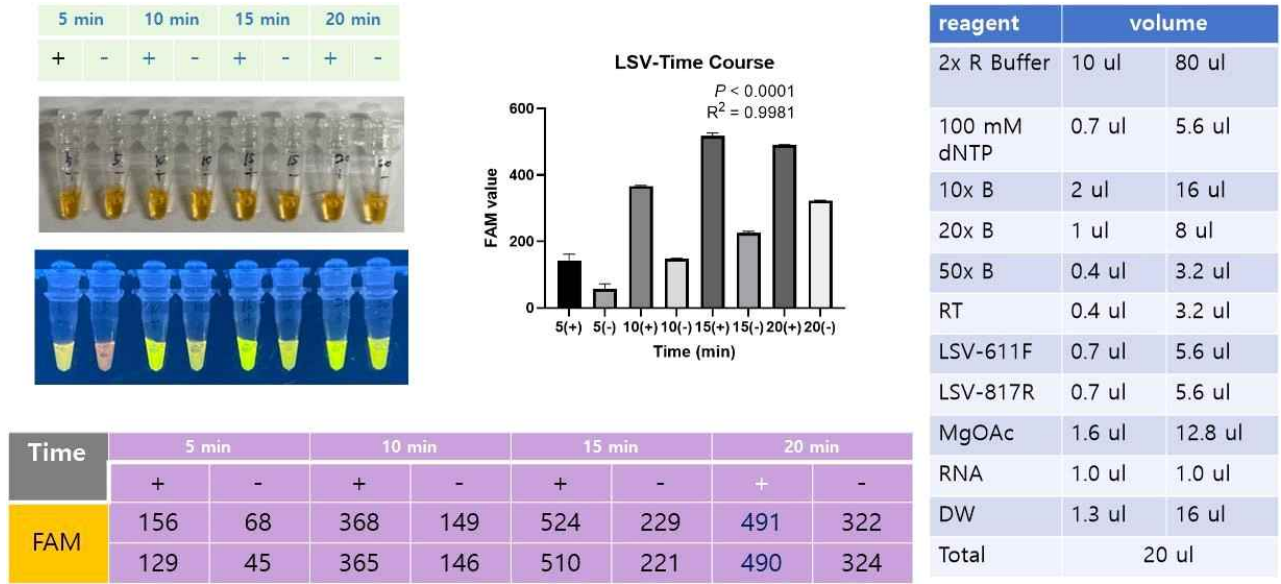
<그림 1-34> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with LSV primer and probe set.



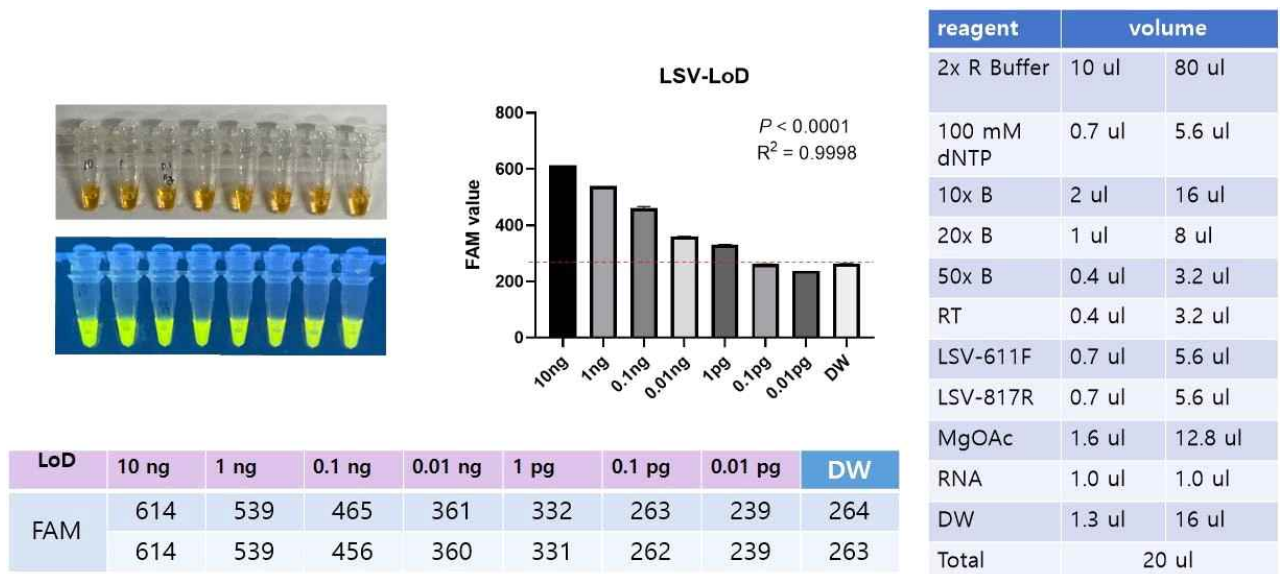
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSVnfo-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-817R	0.7 ul	5.6 ul
LSVnfo-704P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-35> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with LSV primer and probe set.

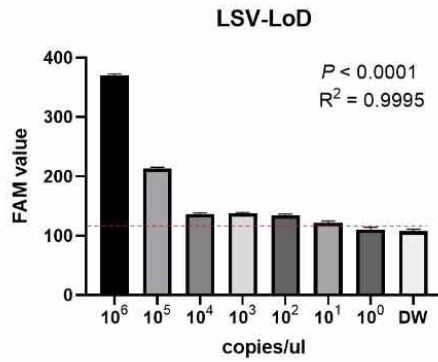
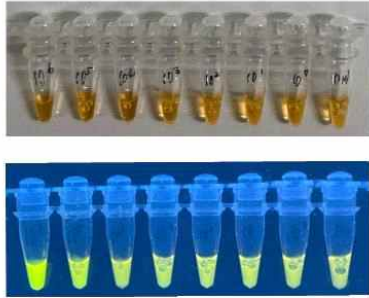
■ LSV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



<그림 1-36> RT-RPA end point detection reaction of LSV primer set according to the time.



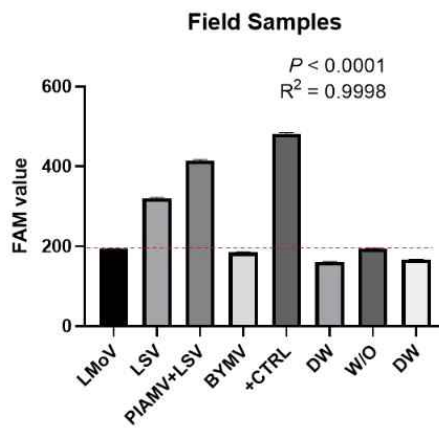
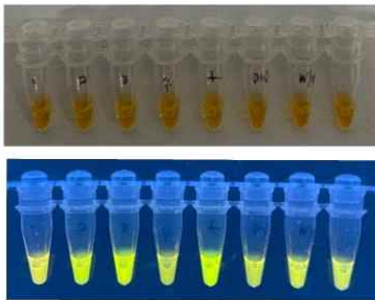
<그림 1-37> LoD (ng/ul) of LSV RT-RPA end point detection kit.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSV-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSV-817R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	372	215	138	139	136	124	113	110
	369	212	135	136	133	120	108	105

<그림 1-38> LoD (copies/ul) of LSV RT-RPA end point detection kit.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
LSV-611F	0.7 ul	5.6 ul
LSV-817R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

	LMoV	LSV	PIAM V+LSV	BYMV	+CTRL	DW	W/O	DW
FAM	194	322	417	186	484	162	195	168
	193	318	413	184	480	160	192	166

<그림 1-39> RT-RPA end point detection reaction of LSV primer set with several viruses.

- 사이버그린을 이용한 LSV end point detection kit는 반응 후 5분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-36).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-37).

- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-38).
- 4가지 관련바이러스 (Lily symtomless virus, Bean yellow mosaic virus, Plantago asiatica mosaic virus)와 RPA 반응을 시켜본 결과 LSV 감염된 샘플과 잘 반응하였다 (그림 1-39).

3. Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) - RPA probe 진단제 개발



○ Plantago asiatica mosaic virus(PIAMV)는 길이가 약 490~530nm, 너비가 10~15nm인 유연한 비리온을 가지고 있습니다. PIAMV의 게놈은 약 6.13kb의 단일 가닥 포지티브 센스 RNA로 구성됩니다. 여기에는 추정 바이러스 중합효소(RdRp), 이동 단백질(삼중 유전자 블록 단백질, TGBp1-3) 및 외피 단백질(CP)을 각각 인코딩하는 5개의 open reading frame (ORF 1-5)이 포함되어 있습니다.

○ PIAMV는 매우 넓은 숙주 범위를 가지며 Plantago asiatica, Nandina domestica, Rehmannia glutinosa 및 기타 잡초 식물을 포함한 다양한 야생 식물에서 분리되었습니다. 실험적으로 PIAMV는 Nicotiana benthamiana 및 Arabidopsis thaliana를 포함한 많은 식물 종을 감염시킬 수 있습니다. 또한 장식용 백합을 감염시키고 종종 심한 괴사 증상을 유발합니다. 그러나 숙주 범위는 종 내에서 상당한 생물학적 다양성을 나타내는 분리주에 따라 다릅니다.

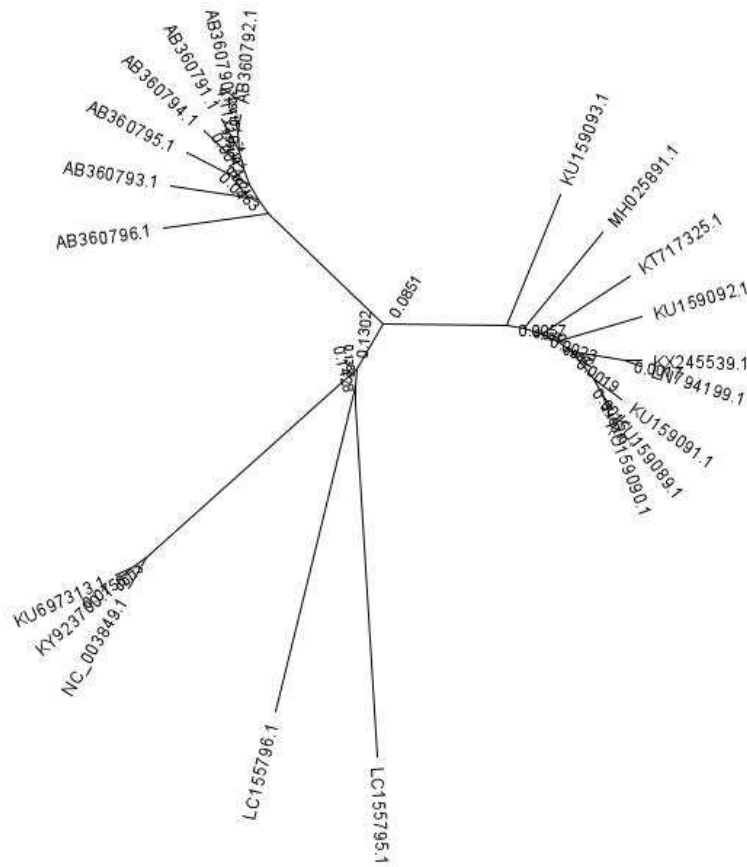
○ PIAMV는 계통발생학적 분석을 기반으로 5개의 클레이드로 분리될 수 있습니다. 뉴클레오타이드 정체성은 다른 클레이드의 분리주 사이에서 상당히 낮습니다.

○ PIAMV는 생물학적 벡터에 의해 전파되는 것으로 보고되지 않았습니다. PIAMV의 비리온은 매우 안정적이며 기계적 접촉에 의해 효율적으로 전파될 수 있습니다.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9452766/>)

LC155795.1	LC155796.1	KY923700.1	KU697313.1	NC_003849.1	KU159093.1	KU159092.1	MH025891.1	KT171325.1	KX245539.1	LN794199.1	KU159091.1	KU159089.1	KU159090.1	AB360796.1	AB360793.1	AB360795.1	AB360794.1	AB360791.1	AB360790.1	AB360792.1
75.9%	76.3%	76.6%	75.9%	76.2%	76.0%	76.1%	76.1%	76.2%	76.2%	76.0%	76.1%	76.1%	76.1%	76.2%	76.3%	76.6%	76.6%	76.6%	76.6%	76.5%
75.9%	76.8%	76.8%	77.8%	76.4%	76.7%	76.5%	76.5%	76.7%	76.7%	76.6%	76.6%	76.6%	76.6%	76.8%	76.8%	77.0%	77.0%	77.0%	77.0%	77.0%
76.3%	76.8%	86.4%	85.7%	77.9%	77.6%	77.6%	77.6%	77.7%	77.7%	77.6%	77.7%	77.7%	77.7%	77.8%	77.7%	77.8%	77.9%	77.9%	77.9%	77.9%
76.6%	77.8%	86.4%	86.4%	78.1%	77.8%	77.9%	77.8%	77.9%	78.0%	77.9%	77.9%	77.9%	77.9%	78.2%	77.9%	78.0%	78.0%	78.0%	77.9%	77.9%
75.9%	76.4%	85.7%	86.4%	77.6%	77.4%	77.4%	77.3%	77.4%	77.5%	77.4%	77.5%	77.4%	77.4%	77.8%	77.1%	77.2%	77.3%	77.3%	77.3%	77.2%
76.2%	76.7%	77.9%	78.1%	77.6%	98.8%	98.7%	98.8%	98.9%	99.0%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	85.7%	84.9%	85.0%	85.1%	85.1%	85.1%	85.0%
76.0%	76.5%	77.6%	77.8%	77.4%	98.8%	99.2%	99.4%	99.5%	99.4%	99.4%	99.5%	99.4%	99.4%	85.5%	84.7%	84.8%	84.9%	84.8%	84.8%	84.8%
76.1%	76.5%	77.6%	77.9%	77.4%	98.7%	99.2%	99.3%	99.4%	99.4%	99.3%	99.4%	99.3%	99.3%	85.5%	84.7%	84.8%	84.9%	84.9%	84.9%	84.8%
76.1%	76.7%	77.6%	77.3%	77.3%	98.8%	99.4%	99.3%	99.6%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	99.5%	85.5%	84.7%	84.8%	84.9%	84.9%	84.9%	84.8%
76.2%	76.7%	77.7%	77.9%	77.4%	98.9%	99.5%	99.4%	99.6%	99.7%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	85.7%	84.8%	84.9%	85.1%	85.0%	85.0%	84.9%
76.2%	76.7%	77.7%	78.0%	77.5%	99.0%	99.4%	99.4%	99.5%	99.7%	99.5%	99.6%	99.6%	99.6%	85.7%	84.9%	85.0%	85.2%	85.1%	85.1%	85.0%
76.0%	76.6%	77.6%	77.9%	77.4%	98.8%	99.4%	99.3%	99.5%	99.6%	99.6%	99.6%	99.6%	99.7%	85.6%	84.8%	84.9%	85.0%	85.0%	85.0%	84.9%
76.1%	76.6%	77.7%	77.9%	77.5%	98.9%	99.5%	99.4%	99.5%	99.7%	99.6%	99.6%	99.6%	99.9%	85.6%	84.7%	84.8%	84.9%	84.9%	84.9%	84.8%
76.1%	76.6%	77.7%	77.9%	77.4%	98.9%	99.4%	99.3%	99.5%	99.6%	99.6%	99.7%	99.9%	99.9%	85.6%	84.8%	84.8%	85.0%	84.9%	84.9%	84.8%
76.2%	76.8%	77.8%	78.2%	77.8%	85.7%	85.5%	85.5%	85.5%	85.7%	85.7%	85.6%	85.6%	85.6%	91.3%	91.3%	91.4%	91.5%	91.4%	91.5%	91.4%
76.3%	76.8%	77.7%	77.8%	77.1%	84.9%	84.7%	84.7%	84.7%	84.8%	84.9%	84.8%	84.7%	84.8%	91.3%	91.3%	99.5%	99.6%	99.5%	99.6%	99.5%
76.6%	77.0%	77.8%	78.0%	77.2%	85.0%	84.8%	84.8%	84.8%	84.9%	85.0%	84.9%	84.8%	84.9%	91.4%	99.5%	99.8%	99.8%	99.6%	99.7%	99.7%
76.6%	77.0%	77.9%	78.0%	77.3%	85.1%	84.9%	84.9%	84.9%	85.1%	85.2%	85.0%	84.9%	85.0%	91.5%	99.6%	99.8%	99.8%	99.8%	99.9%	99.8%
76.6%	77.1%	77.9%	78.0%	77.3%	85.1%	84.8%	84.9%	84.9%	85.0%	85.1%	85.0%	84.9%	84.9%	91.4%	99.5%	99.6%	99.8%	99.8%	99.9%	99.9%
76.6%	77.0%	77.9%	77.9%	77.3%	85.1%	84.8%	84.9%	84.9%	85.0%	85.1%	85.0%	84.9%	84.9%	91.5%	99.6%	99.7%	99.9%	99.9%	99.9%	99.9%
76.5%	77.0%	77.9%	77.9%	77.2%	85.0%	84.8%	84.8%	84.8%	84.9%	85.0%	84.9%	84.8%	84.9%	91.4%	99.5%	99.7%	99.8%	99.9%	99.9%	99.9%

<그림 1-40> Homology distance of 21 cases of PIAMV isolates.



<그림 1-41> Phylogenic tree of 21 cases of PIAMV isolates.

1. **PIAMV** - 4,195 F :

5'- CAGGXXXXGTTTCGTXXXXTTAGTTAAGTTC-3'

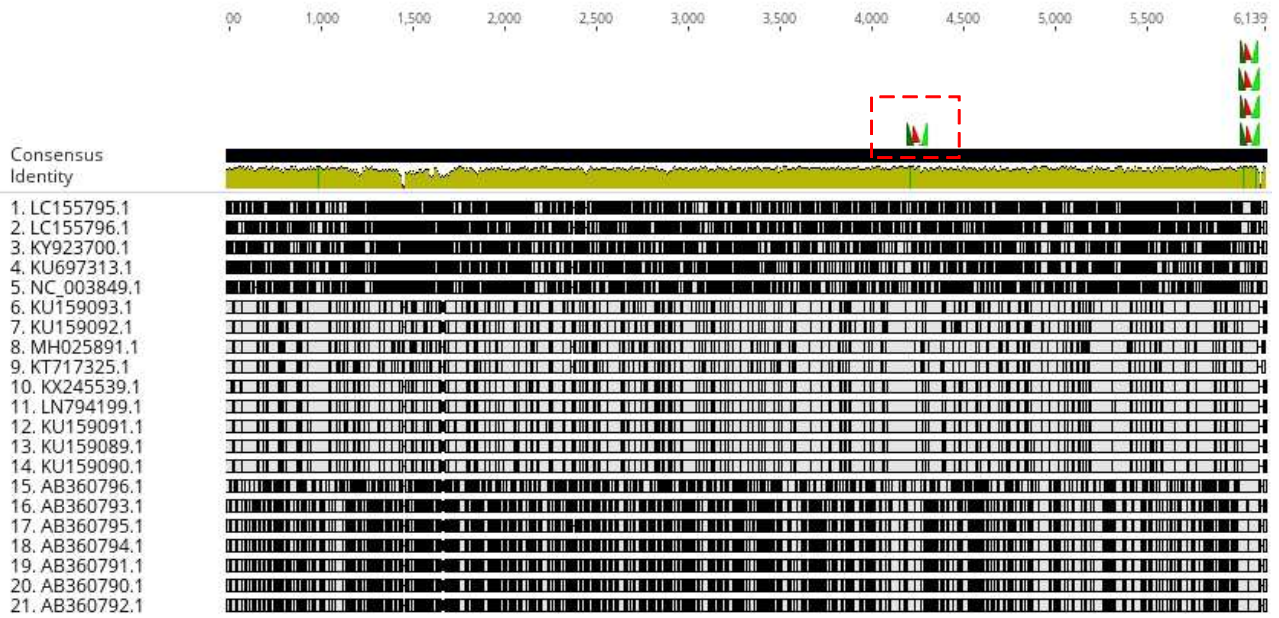
2. **PIAMV** - 4,229 P :

5'- TCG XXX XXX AGT TAA GTT CGG TGG TTC ACC [FAM-dT] T
[THF] CC [BHQ1-dT] TAX XXX AAC ATG -3' Spacer C

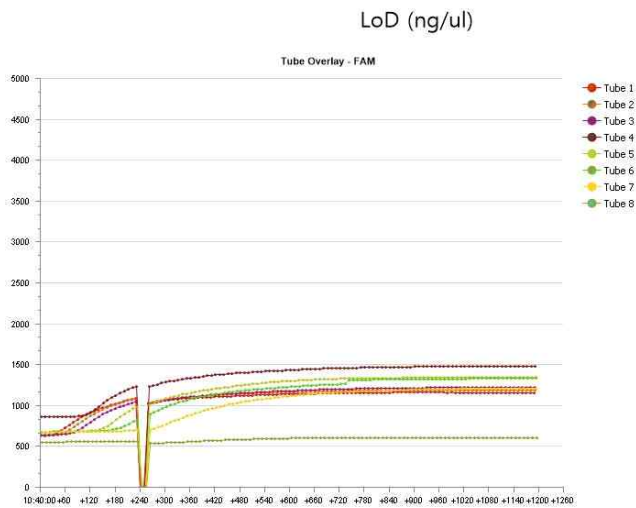
3. **PIAMV** - 4,304 R :

5'- TAGTTXXXXGAAAGTTXXXXGATGTTAGTGC -3'

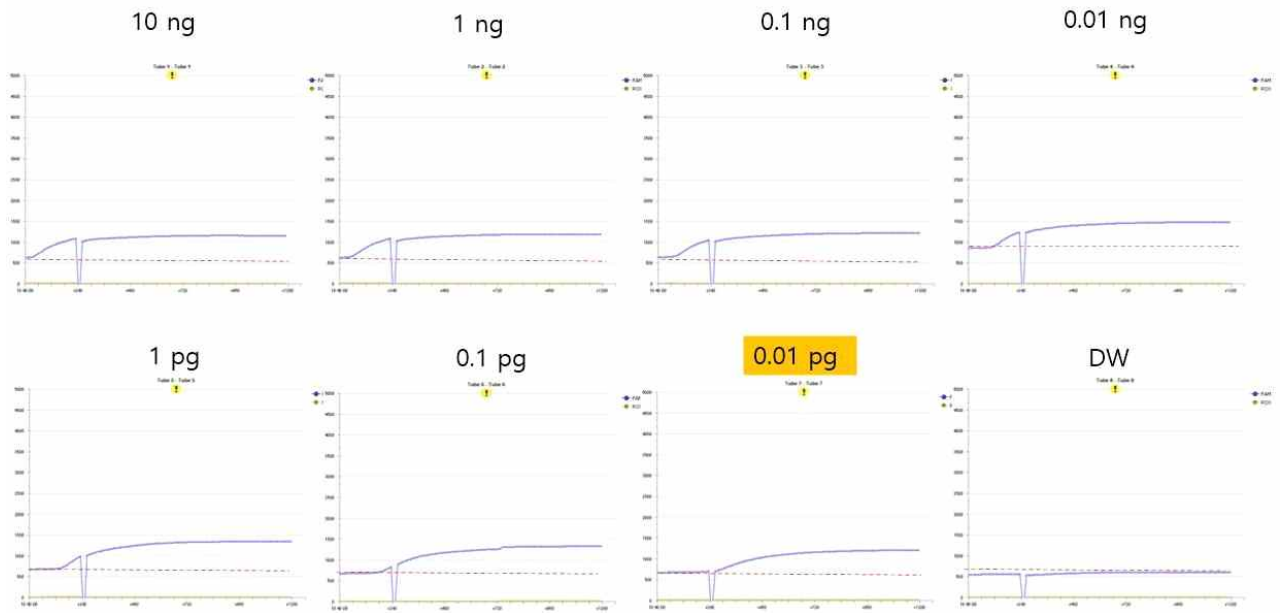
<그림 1-42> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 21 cases of PIAMV isolates.



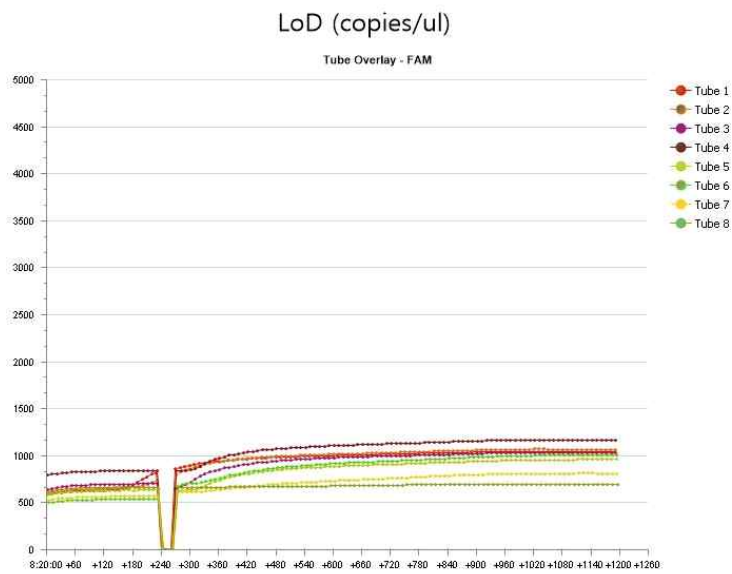
<그림 1-43> RPA exo primer and probe set of 21 cases of PIAMV isolates.



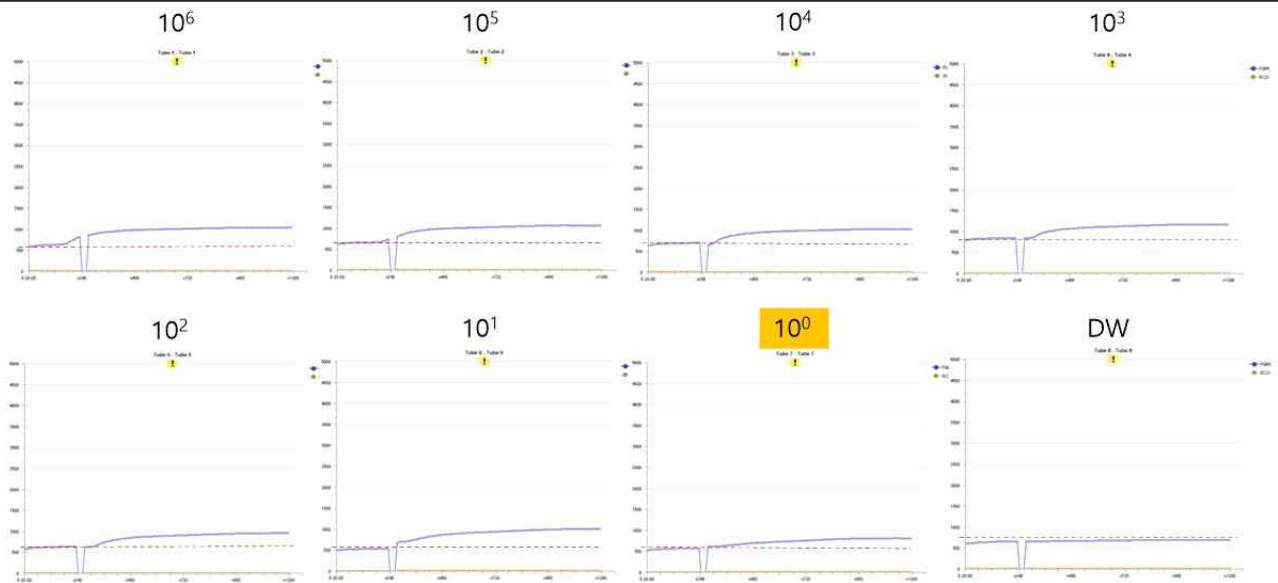
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV - 4,195 F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,304 R	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,229 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	



<그림 1-44> Limitation of Detection (ng/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of PIAMV.



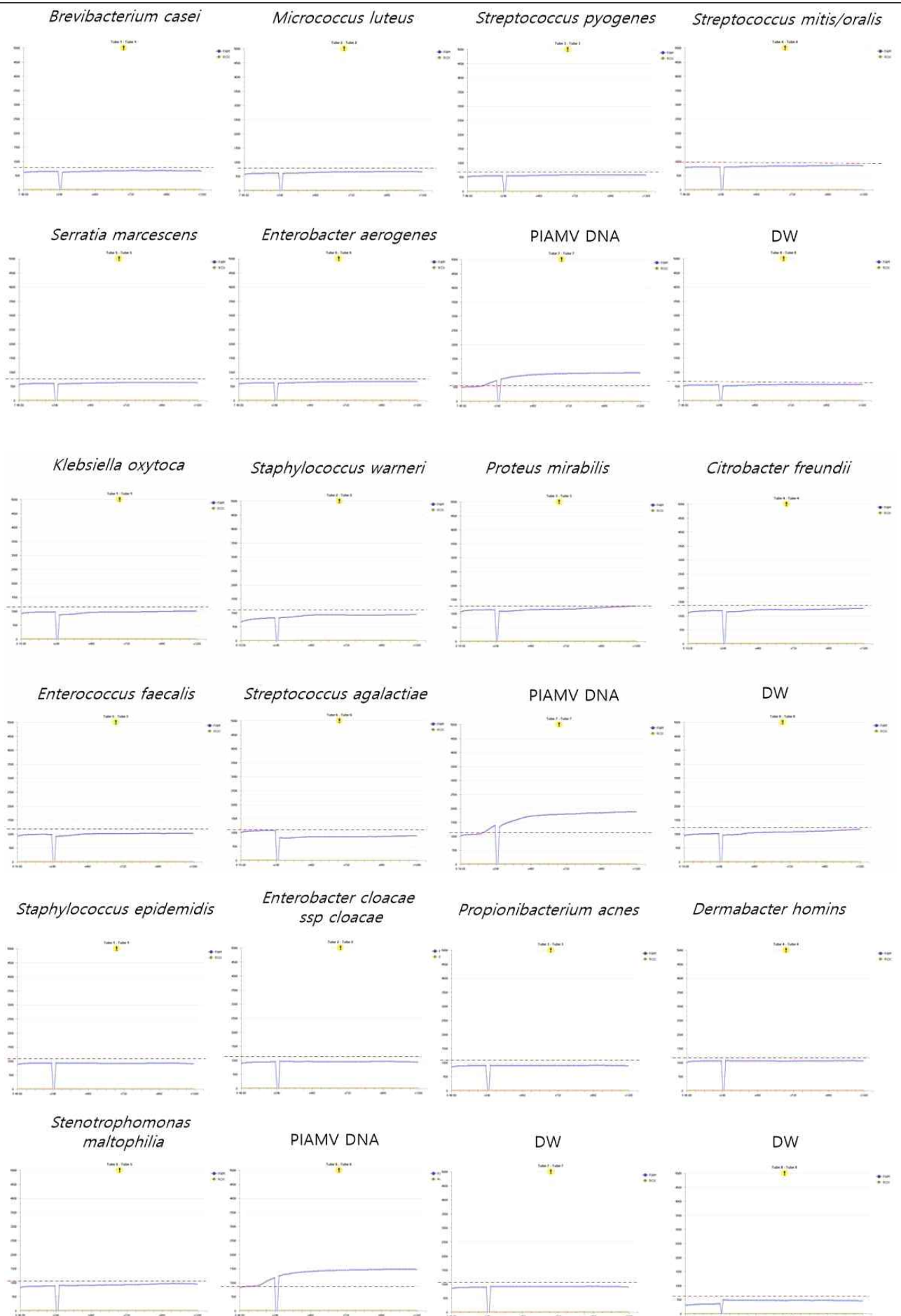
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV - 4,195 F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,304 R	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,229 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	



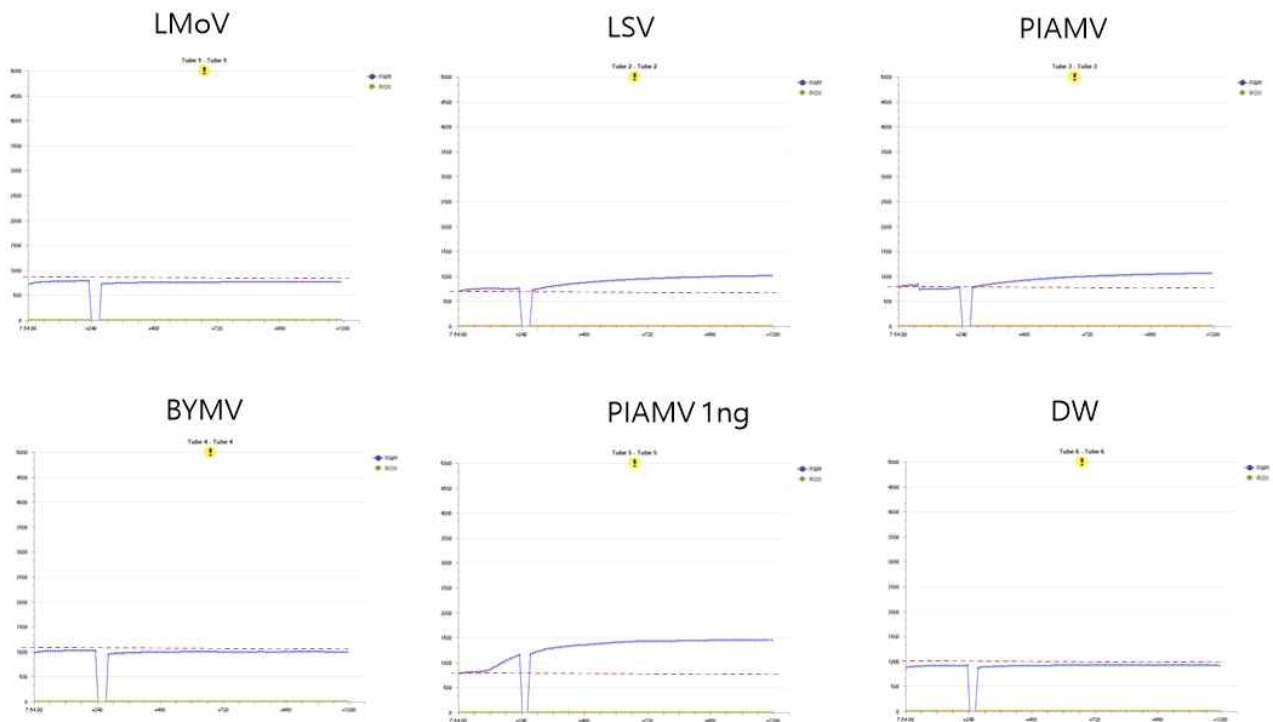
<그림 1-45> Limitation of Detection (copies/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of PIAMV.

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV - 4,195 F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,304 R	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV - 4,229 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	PIAMV - mRNA transcript	Positive



<그림 1-46> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of PIAMV with several bacteria.



<그림 1-47> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of PIAMV with several viruses.

- PIAMV isolates 21건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 세 개의 그룹으로 나누어지고 있었으나 분리주 간에 크게는 25%이상의 변이가 관찰되었다 (그림 1-41, 42).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3' 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; PIAMV-4195F, PIAMV-4229P, PIAMV-4304R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-43).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-44).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-45).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 PIAMV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-46).
- RPA Exo kit를 사용하여 다른 3종의 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, PIAMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-47).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-47).
- 이상의 결과로 RT-RPA PIAMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-48, 49).
- 엘씨엠싸이언스 홈페이지에 등록하여 시판을 실시하였다 (그림 1-50).



<그림 1-48> PIAMV ER detection kit.

Revision No.: LCM-PIAMV-ER-0001
 Issue Date: Jul 03, 2023
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwasong-si Gyeonggi-do South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20 °C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of PIAMV gene to detect the PIAMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) has flexuous virions of approximately 490–530 nm in length and 10–15 nm in width. The genome of PIAMV consists of a single-stranded, positive-sense RNA of approximately 6.13 kb. It contains five open reading frames (ORFs 1–5), encoding a putative viral polymerase (RdRp), movement proteins (triple gene block proteins, TGBp1-3), and coat protein (CP), respectively.

PIAMV has an exceptionally wide host range and has been isolated from various wild plants, including Plantago asiatica, Nandina domestica, Rehmannia glutinosa, and other weed plants. Experimentally PIAMV can infect many plant species including Nicotiana benthamiana and Arabidopsis thaliana. It also infects ornamental lilies and frequently causes severe necrotic symptoms. However, host range varies depending on isolates, which show significant biological diversity within the species.

PIAMV is not reported to be transmitted by biological vectors. Virions of PIAMV are quite stable and it can be transmitted efficiently by mechanical contact. PIAMV causes red-rusted systemic necrosis in ornamental lilies, but it shows much weaker, if any, symptoms in wild plants such as P. asiatica. PIAMV can be separated into five clades based on phylogenetic analyses; nucleotide identities are significantly low between isolates in the different clades.

The Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Plantago asiatica mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the PIAMV gene for the unique amplification of Plantago asiatica mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	PIAMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	PIAMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	PIAMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	PIAMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner / CFX96 real time PCR / Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	PIAMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	PIAMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	PIAMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20 °C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

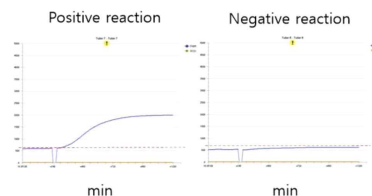
Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40 °C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result

Exp. example



<Example of PIAMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	PIAMV RNA	Interpretation
1	+	-	+	PIAMV Positive
2	+	-	-	PIAMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20 °C to -80 °C.



Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit

₩ 600,000

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 PIAMV를 검출하는 분자진단제입니다.

+ 1 -

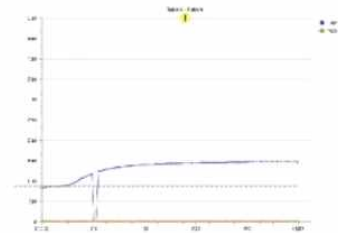
600,000원

바로구매 장바구니

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit

Research use only

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit는 감염된 작물로 부터 PIAMV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.



Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit*Research use only*

제품스펙	주문정보	관련제품
------	------	------

사용목적

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 PIAMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit*Research use only***제품스펙**

검체	PIAMV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
민감도	10 ⁰ copies/ul
특이도	100%
보관온도	-20°C

Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit*Research use only***주문정보**

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-PIAMV-ER-50	Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

<그림 1-50> PIAMV ER Detection kit in LCM science Homepage.

■ PIAMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. **PIAMVnfo** - 4,195 F :

5'- CAGXXXXCGGTTCGTGATTXXXXTAAGTTC-3'

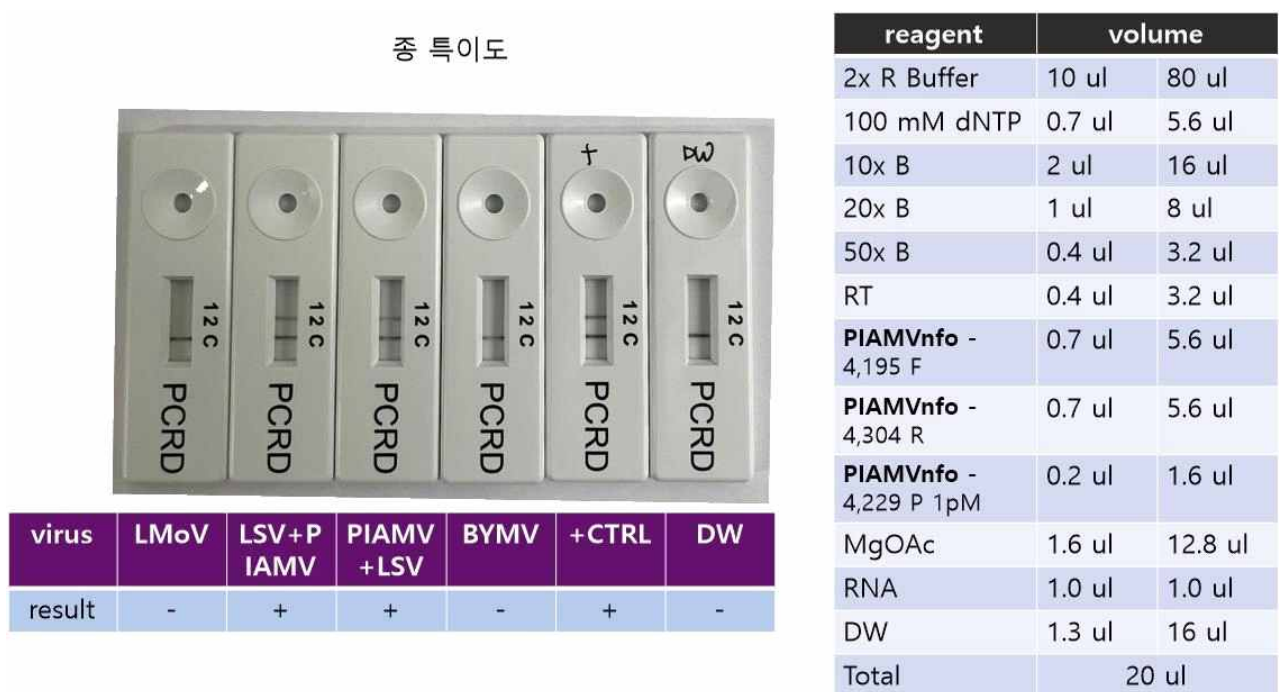
2. **PIAMVnfo** - 4,229 P :

5'- [FAM] TCG TGA XXX XXX TAA GTT CGG TGG TTC ACC T
[THF] CC TA ACT CCG XXX XXX ATG -3' Spacer C

3. **PIAMVnfo** - 4,304 R :

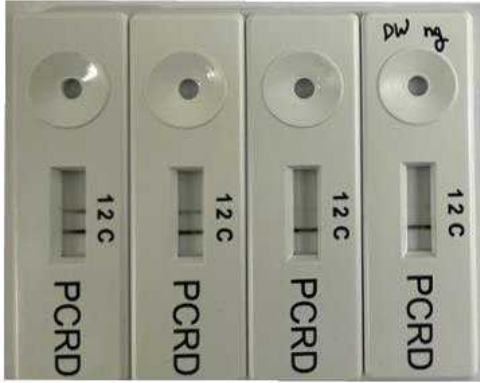
5'- [Biotin] TAGTXXXXXAAAGTTGTTAGAXXXTAGTGC -3'

<그림 1-51> RT-RPA nfo primer probe set of PIAMV.



<그림 1-52> PIAMV RT-RPA nfo reaction with several related viruses.

LoD (ng/ul)



LoD	1 pg	0.1 pg	0.01 pg	DW
Result	+	+	+w	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMVnfo - 4,195 F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMVnfo - 4,304 R	0.7 ul	5.6 ul
PIAMVnfo - 4,229 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-53> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with PIAMV primer and probe set.

LoD (copies/ul)



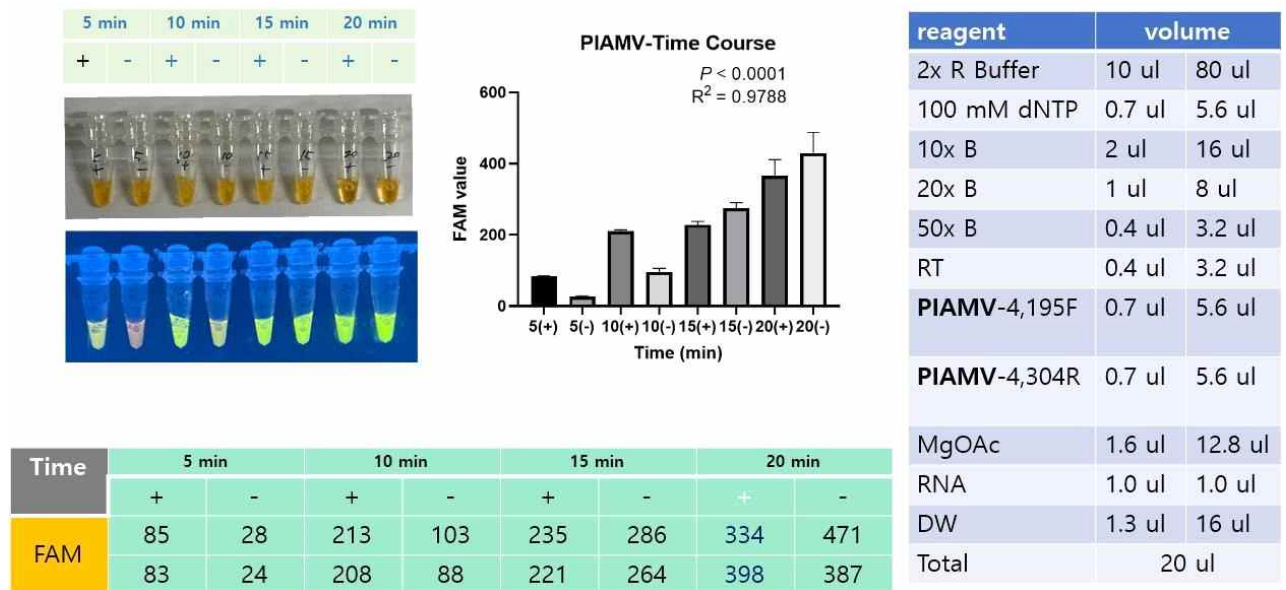
LoD	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	DW
Result	+	+	+	+	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMVnfo - 4,195 F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMVnfo - 4,304 R	0.7 ul	5.6 ul
PIAMVnfo - 4,229 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

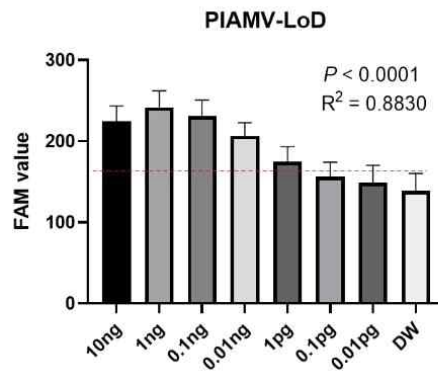
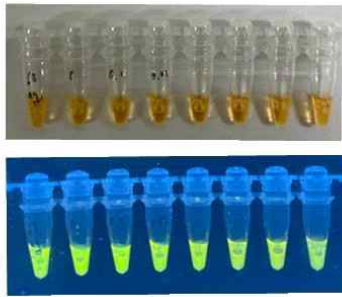
<그림 1-54> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with PIAMV primer and probe set.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT PIAMV primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-51).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- RPA nfo kit를 사용하여 다른 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, PIAMV에 감염된 샘플에 잘 반응하였다 (그림 1-52).
- 검출한계는 0.01 pg, 100 copies/ul까지 가능하였다 (그림 1-53, 54).

■ PIAMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



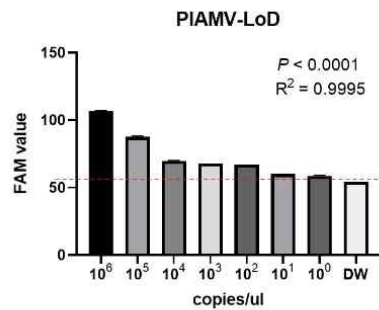
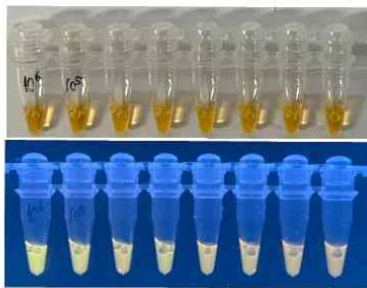
<그림 1-55> RT-RPA end point detection reaction of PIAMV primer set according to the time.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV-4,195F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV-4,304R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

LoD	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng	1 pg	0.1 pg	0.01 pg	DW
FAM	238	256	245	218	188	169	164	154
	211	227	217	195	162	144	133	123

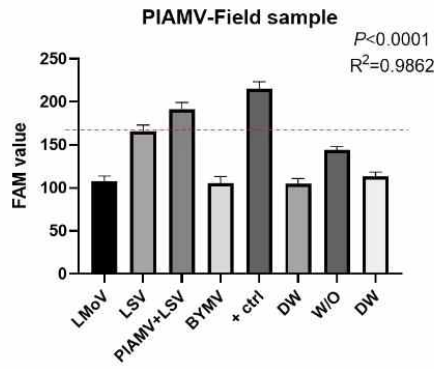
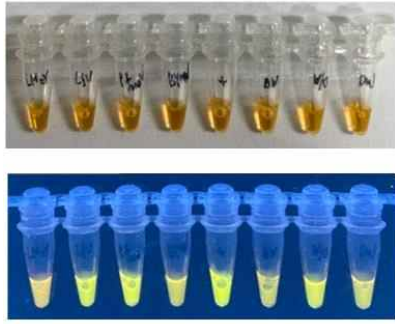
<그림 1-56> LoD (ng/ul) of PIAMV RT-RPA end point detection kit.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV-4,195F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV-4,304R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	106	87	69	68	67	60	58	54
	107	88	70	68	67	60	59	54

<그림 1-57> LoD (copies/ul) of PIAMV RT-RPA end point detection kit.



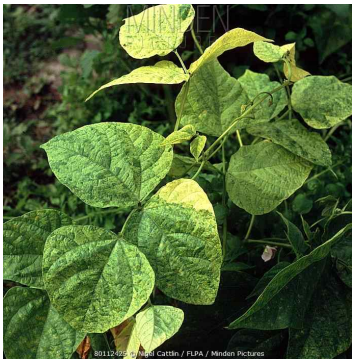
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
PIAMV-4,195F	0.7 ul	5.6 ul
PIAMV-4,304R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

	LMoV	LSV	PIAMV V+LSV	BYMV	+CTRL	DW	W/O	DW
FAM	112	171	197	111	221	109	147	117
	103	161	186	100	209	100	141	110

<그림 1-58> RT-RPA end point detection reaction of PIAMV primer set with several viruses.

- 사이버그린을 이용한 PIAMV end point detection kit는 반응 후 5분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-55).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-56).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-57).
- 4가지 관련바이러스 (Lily symptomless virus, Bean yellow mosaic virus, Plantago asiatica mosaic virus)와 RPA 반응을 시켜본 결과 PIAMV 감염된 샘플과 잘 반응하였다 (그림 1-58).

4. Bean yellow mosaic virus (BYMV) - RPA probe 진단제 개발



- 콩황색모자이크바이러스는 Potyvirus속과 Potyviridae과에 속하는 식물병원성 바이러스이다. Potyvirus 속의 다른 구성원과 마찬가지로 단일 바이러스 암호화 단백질을 위해 만들어진 캡시드로 둘러싸인 포지티브 센스, 단일 가닥 RNA의 단일 가닥입니다. 바이러스는 길이가 약 750nm인 실 모양의 입자입니다. 이 바이러스는 진딧물 종과 기계적 접촉에 의해 전염됩니다.

○ 콩 황색 모자이크 바이러스로 여겨지는 모자이크 질병은 1900년대 초 미국 북동부에서 정원 완두콩(*Pisum sativum*)을 감염시키는 것으로 처음 보고되었습니다. 현재 이 바이러스는 전 세계적으로 확산된 것으로 추정됩니다.

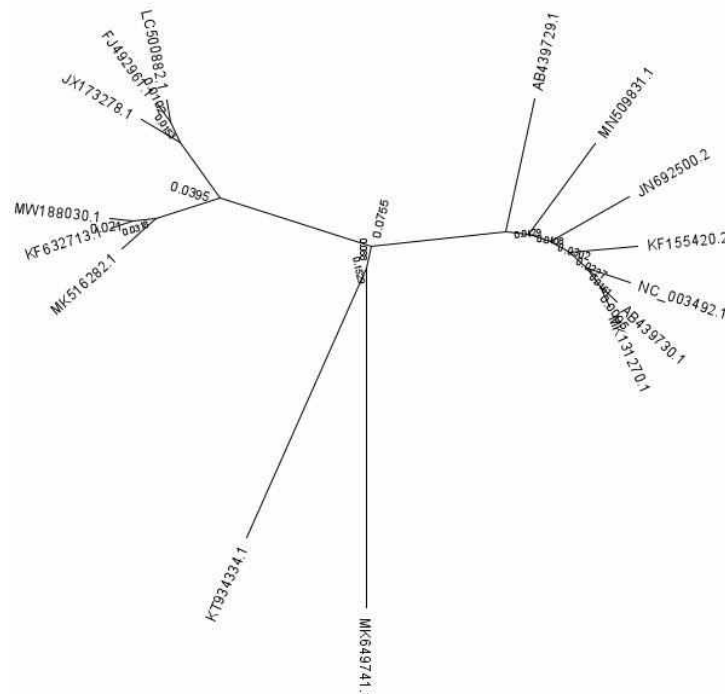
○ 완두콩 외에도 이 바이러스는 녹두(*Phaseolus vulgaris*), 땅콩(*Arachis hypogaea*), 대두(*Glycine max*), 파바콩(*Vicia faba*), 여러 종을 포함한 많은 다른 콩류(*Fabaceae*과)를 감염시키는 것으로 알려져 있습니다. 클로버(*Trifolium hybridum*, *T. vesiculosum*, *T. incarnatum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. subterraneum*), 알팔파(*Medicago sativa*), vetch(*Vicia sativa*), 루핀(*Lupinus luteus*), 검은 메뚜기 (*Robinia pseudoacacia*), 호로파(*Trigonella foenum-graecum*) 및 *Crotalaria spectabilis* 등도 감염시킵니다.

○ 또한 *Gladiolus sp.*, *Fressia sp.*, 아편 양귀비(*Papaver somniferum*), *Canna spp.*를 포함하여 콩과가 아닌 여러 식물을 감염시키는 것으로 알려져 있습니다.

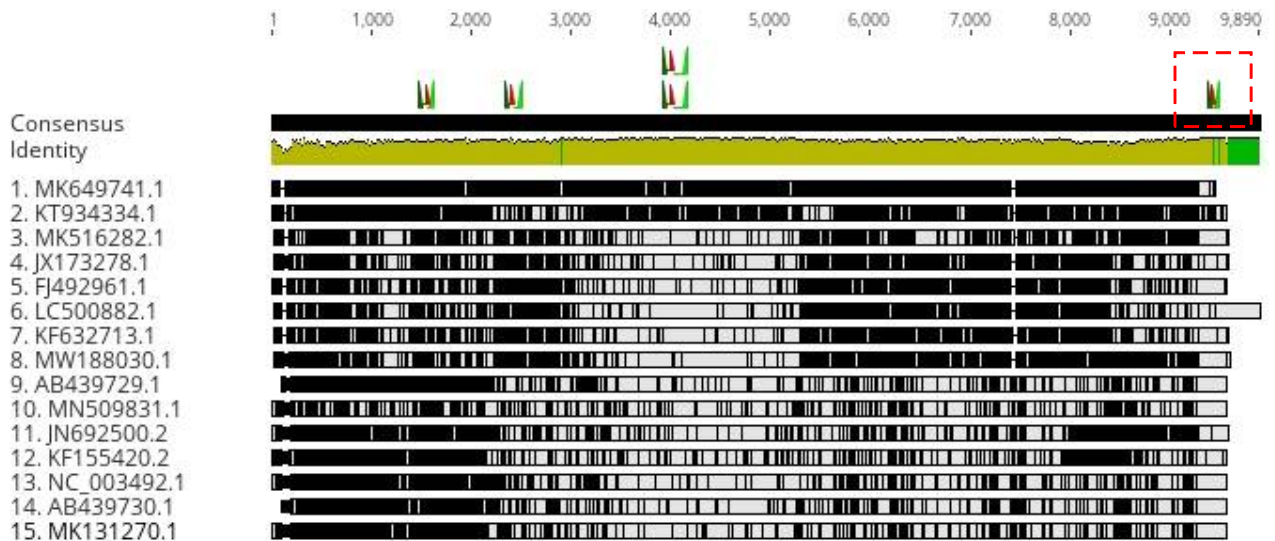
○ 식물의 증상으로는 모자이크, 잎 기형 및 잎 반점이 있습니다. 이 바이러스는 두 종류의 바이러스 내포물, 즉 적층 응집체와 핵 내포물을 만듭니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Bean_yellow_mosaic_virus).

	MK649741.1	KT934334.1	MK516282.1	JX173278.1	FJ492961.1	LC500882.1	KF632713.1	MW188030.1	AB439729.1	MN509831.1	JN692500.2	KF155420.2	NC_003492.1	AB439730.1	MK131270.1
MK649741.1		74.9%	76.0%	76.0%	75.9%	76.0%	75.7%	75.7%	75.1%	75.1%	73.5%	74.0%	75.0%	75.4%	75.1%
KT934334.1	74.9%		85.6%	82.7%	82.3%	82.7%	84.3%	85.4%	89.1%	84.8%	84.2%	83.8%	84.8%	85.3%	85.3%
MK516282.1	76.0%	85.6%		91.9%	91.2%	91.5%	93.6%	94.4%	87.5%	90.7%	86.2%	86.3%	87.7%	87.6%	87.6%
JX173278.1	76.0%	82.7%	91.9%		96.7%	97.2%	94.8%	92.3%	85.6%	90.1%	83.7%	85.0%	86.9%	86.7%	86.6%
FJ492961.1	75.9%	82.3%	91.2%	96.7%		98.0%	93.8%	91.5%	85.3%	89.7%	83.2%	84.8%	86.5%	86.3%	86.4%
LC500882.1	76.0%	82.7%	91.5%	97.2%	98.0%		94.3%	91.9%	85.7%	90.2%	83.7%	85.1%	86.9%	86.8%	86.7%
KF632713.1	75.7%	84.3%	93.6%	94.8%	93.8%	94.3%		96.0%	85.9%	90.3%	83.9%	85.4%	87.2%	87.0%	87.0%
MW188030.1	75.7%	85.4%	94.4%	92.3%	91.5%	91.9%	96.0%		85.4%	89.6%	84.7%	84.7%	86.4%	85.9%	86.0%
AB439729.1	75.1%	89.1%	87.5%	85.6%	85.3%	85.7%	85.9%	85.4%		92.0%	89.4%	91.2%	92.9%	92.6%	92.7%
MN509831.1	75.1%	84.8%	90.7%	90.1%	89.7%	90.2%	90.3%	89.6%	92.0%		90.5%	91.8%	92.4%	93.2%	93.0%
JN692500.2	73.5%	84.2%	86.2%	83.7%	83.2%	83.7%	83.9%	84.7%	89.4%	90.5%		94.9%	93.0%	94.6%	94.2%
KF155420.2	74.0%	83.8%	86.3%	85.0%	84.8%	85.1%	85.4%	84.7%	91.2%	91.8%	94.9%		95.1%	95.9%	95.7%
NC_003492.1	75.0%	84.8%	87.7%	86.9%	86.5%	86.9%	87.2%	86.4%	92.9%	92.4%	93.0%	95.1%		96.8%	96.9%
AB439730.1	75.4%	85.3%	87.6%	86.7%	86.3%	86.8%	87.0%	85.9%	92.6%	93.2%	94.6%	95.9%	96.8%		98.1%
MK131270.1	75.1%	85.3%	87.6%	86.6%	86.4%	86.7%	87.0%	86.0%	92.7%	93.0%	94.2%	95.7%	96.9%	98.1%	

<그림 1-59> Homology distance of 15 cases of BYMV isolates.



<그림 1-60> Phylogenetic tree of 15 cases of BYMV isolates.



<그림 1-61> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 15 cases of BYMV isolates.

1. BYMV - 9,376 F :

5'- TCGTATXXXXTATCCGTCTTXXXXTTCTCTATA -3'

2. BYMV - 9,412 P :

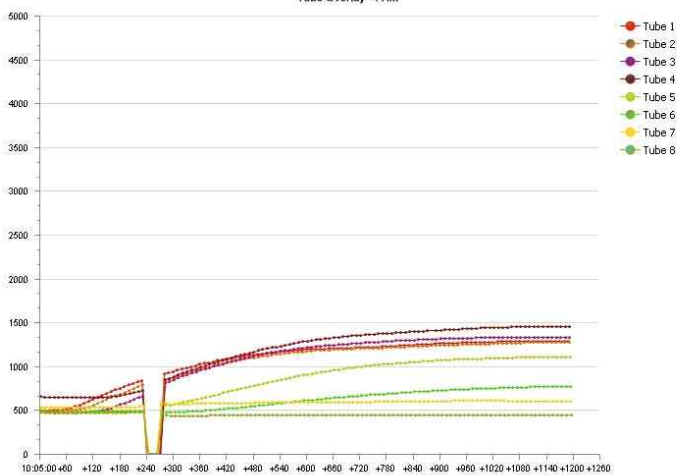
5'- TCT ATA ATT TGG XXX XXC ATT ACT TAA TAC [FAM-dT]A
[THF]G[BHQ1-dT]ATT AGT XXX XXX TCA - 3' Spacer C

3. BYMV - 9,498 R :

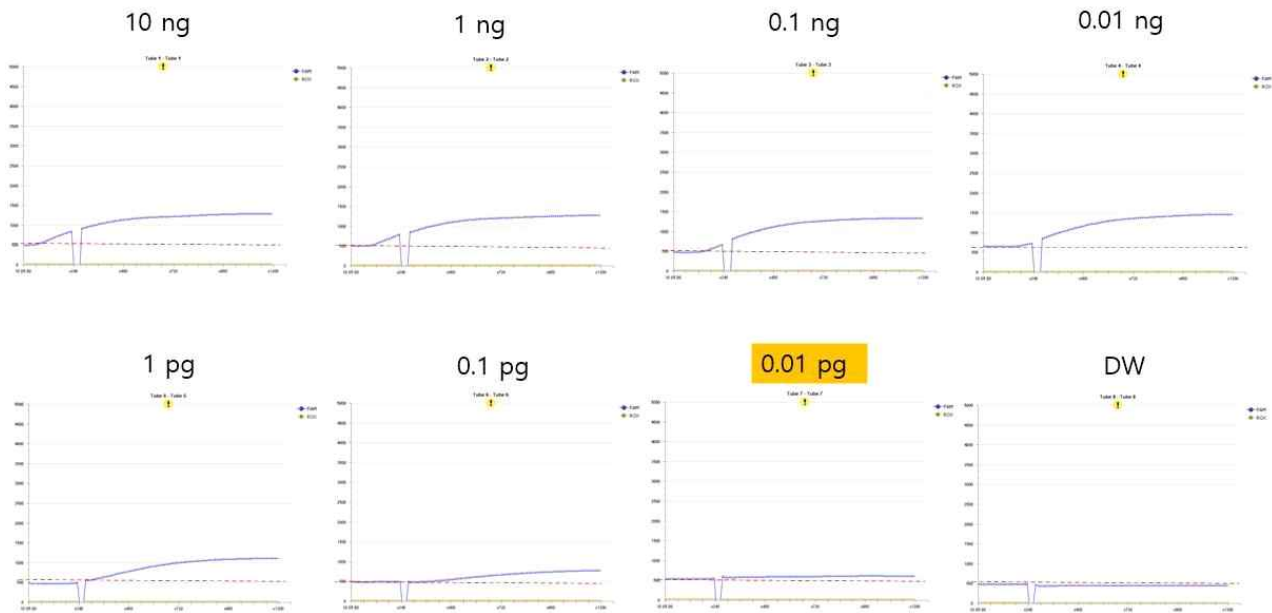
5'- GAGTAGXXXXXATGATACACATXXXXATTAAAA -3'

<그림 1-62> RPA exo primer and probe set of 15 cases of BYMV isolates.

LoD (ng/ul)

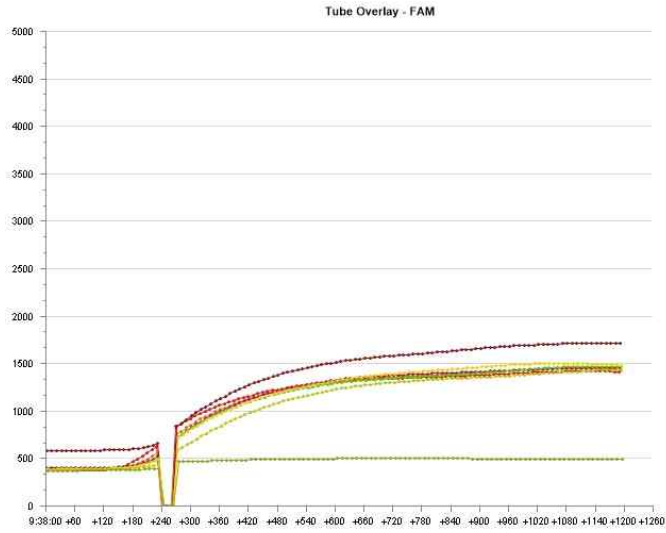


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMV - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,412 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

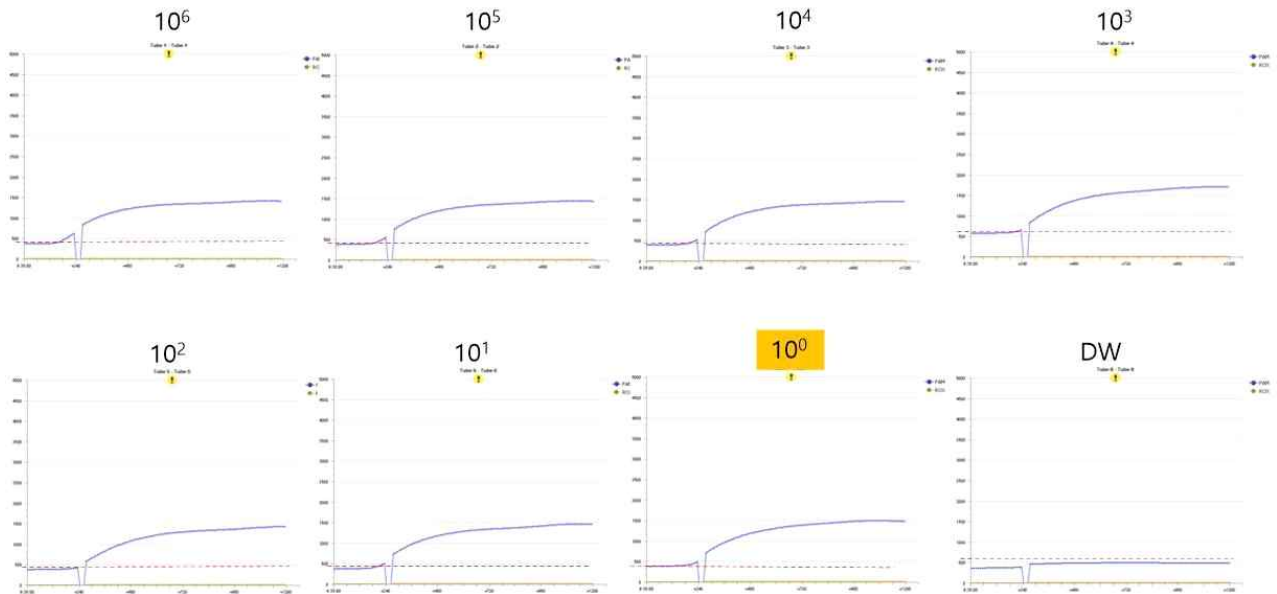


<그림 1-63> Limitation of Detection (ng/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of BYMV.

LoD (copies/ul)



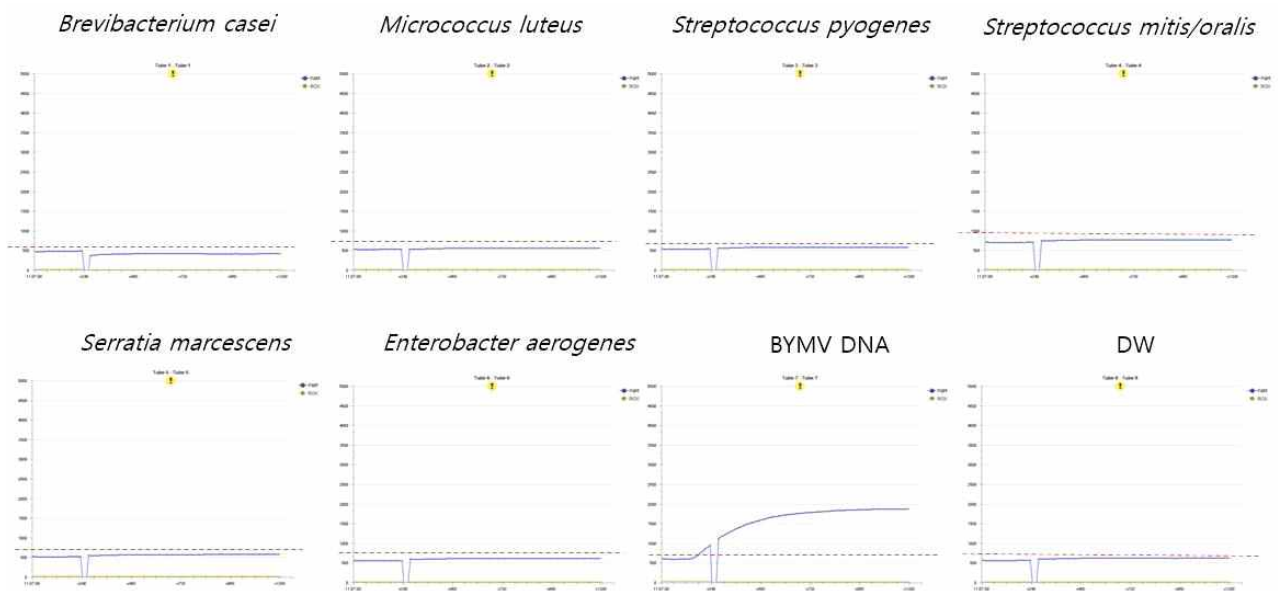
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMV - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,412 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

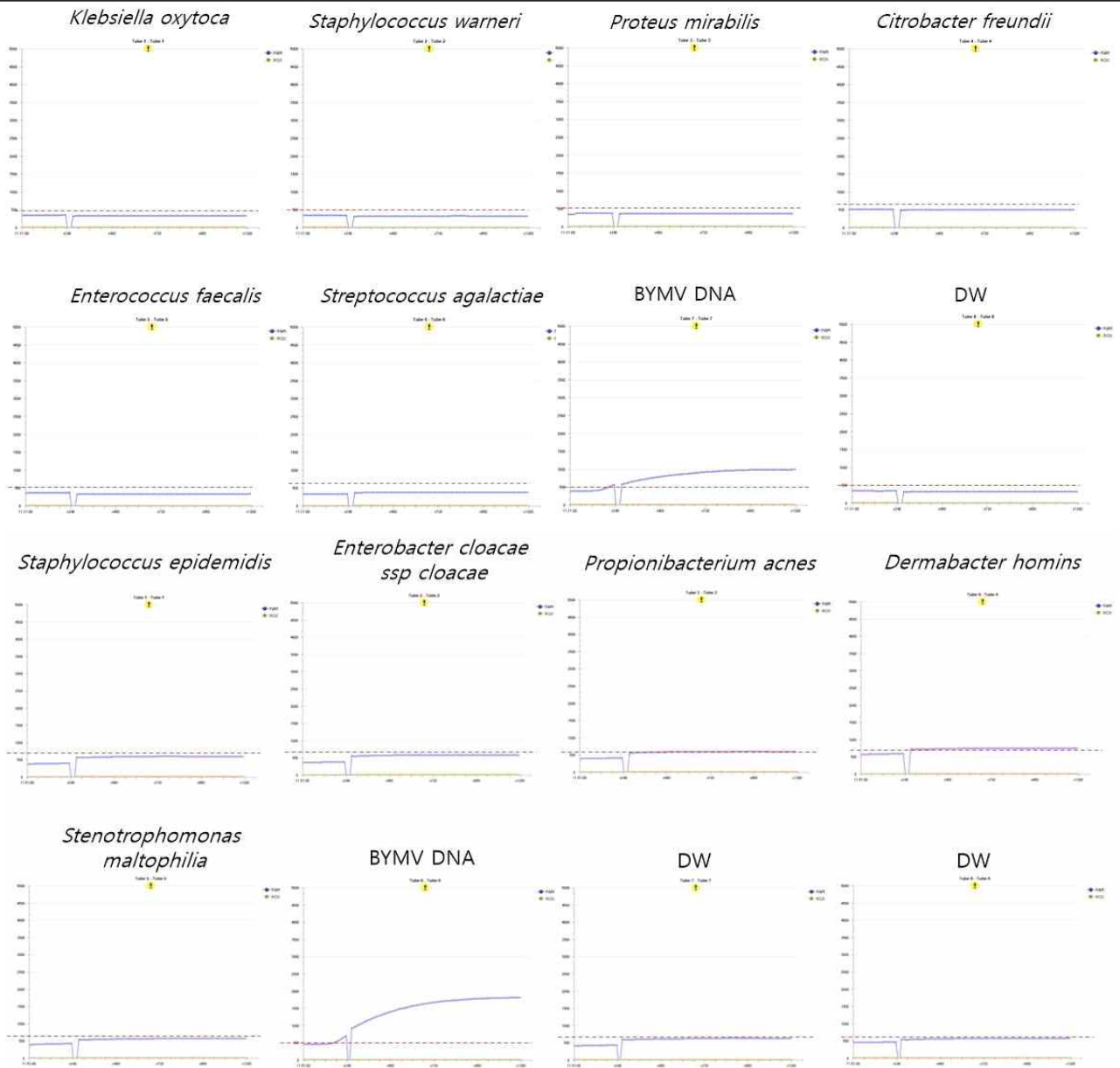


<그림 1-64> Limitation of Detection (copies/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of BYMV.

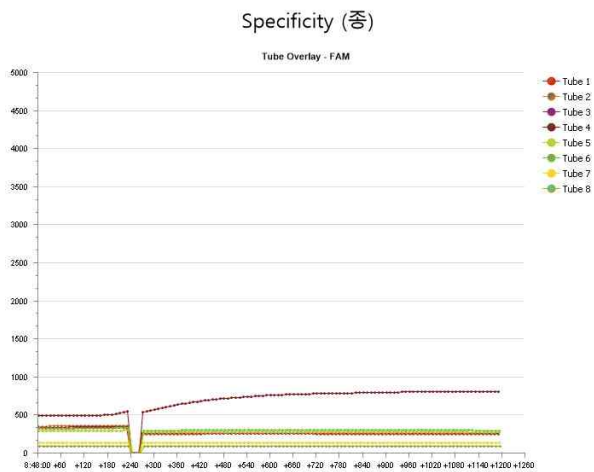
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMV - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,412 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemicus</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	BYMV - mRNA transcript	Positive

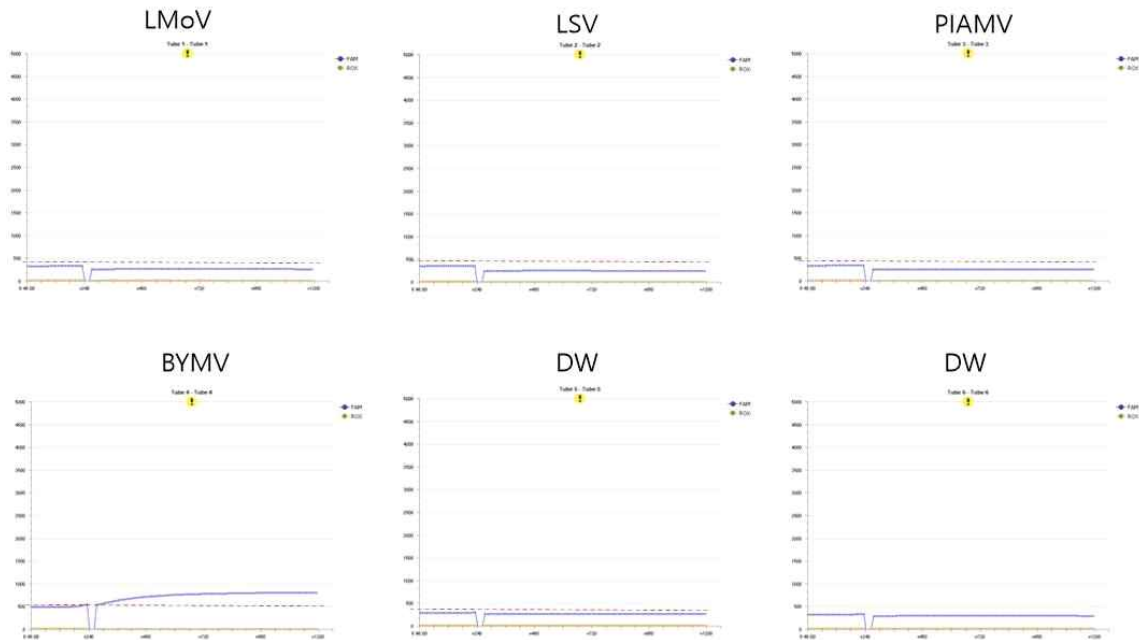




<그림 1-65> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of BYMV with several bacteria.



reagent	volume	volume
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMV - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMV - 9,412 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total		20 ul



<그림 1-66> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of BYMV with several viruses.

- BYMV isolates 15건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 세 개의 그룹으로 나누어지고 있었으나 분리주 간에 크게는 27.5%까지의 변이가 관찰되었다 (그림 1-59, 60).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3' 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; BYMV-9376F, BYMV-9412P, BYMV-9498R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-61, 62).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-63).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-64).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 BYMV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-65).
- RPA Exo kit를 사용하여 다른 3종의 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, BYMV에 감염된 샘플에 잘 반응하였다 (그림 1-66).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-66).
- 이상의 결과로 RT-RPA BYMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-67, 68).
- 엘씨엠싸이언스 홈페이지에 등록하여 시판을 실시하였다 (그림 1-69).



<그림 1-67> BYMV ER detection kit.

Revision No.: LCM-BYMV-ER-0001
 Issue Date: Jul 03, 2023
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Backto-ri Hyangnam-eup Hwasong-gi Gyeonggi-do South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Bean yellow mosaic virus (BYMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of BYMV gene to detect the BYMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Bean yellow mosaic virus is a plant pathogenic virus in the genus Potyvirus and the virus family Potyviridae. Like other members of the Potyvirus genus, it is a monopartite strand of positive-sense, single-stranded RNA surrounded by a capsid made for a single viral encoded protein. The virus is a filamentous particle that measures about 750 nm in length. This virus is transmitted by species of aphids and by mechanical inoculation.

A mosaic disease, believed to be bean yellow mosaic virus, was first reported in the early 1900s infecting garden peas (*Pisum sativum*) in the Northeastern United States. The virus is currently believed to be distributed worldwide.

In addition to peas, this virus is known to infect many other legumes (family Fabaceae) including green beans (*Phaseolus vulgaris*), peanuts (*Arachis hypogaea*), soybeans (*Glycine max*), Faba beans (*Vicia faba*), several species of clover (*Trifolium hybridum*, *T. vesiculosum*, *T. incarnatum*, *T. pratense*, *T. repens*, *T. subterraneum*), alfalfa (*Medicago sativa*), vetch (*Vicia sativa*), lupine (*Lupinus luteus*), black locust (*Robinia pseudoacacia*), fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*), and *Crotalaria spectabilis*.

It also is known to infect several non-leguminous plants including *Gladiolus* sp., *Fressia* sp., opium poppy (*Papaver somniferum*), *Canna* spp. and *Eustoma russellianum*.

Symptoms in these plants include mosaic, leaf malformation and leaf mottling. This virus makes two kinds of viral inclusions, laminated aggregates and a nuclear inclusion.

The Bean yellow mosaic virus (BYMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Bean yellow mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the BYMV gene for the unique amplification of Bean yellow mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	BYMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	BYMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	BYMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	BYMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
 Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	BYMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	BYMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	BYMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 * It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

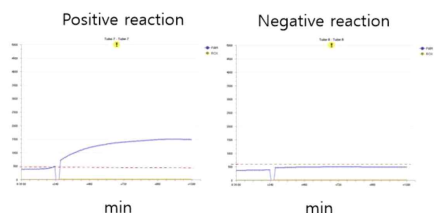
Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 * Unknown: clinical sample
 * Negative control
 * Positive control

8. Reading the Result

Exp. example



<Example of BYMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	BYMV RNA	Interpretation
1	+	-	+	BYMV Positive
2	+	-	-	BYMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.



Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit

₩ 600,000

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 BYMV를 검출하는 분자진단제입니다.

+ 1 -

600,000원

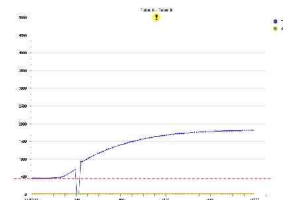
바로구매

장바구니

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit

Research use only

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit 는 감염된 작물로 부터 BYMV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.



Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit*Research use only*

제품스펙	주문정보	관련제품
------	------	------

사용목적

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 BYMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit*Research use only***제품스펙**

검체	BYMV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
민감도	10 ⁰ copies/ul
특이도	100%
보관온도	-20°C

Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit*Research use only***주문정보**

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-BYMV-ER-50	Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

<그림 1-69> BYMV ER Detection kit in LCM science Homepage.

■ BYMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. BYMVnfo - 9,376 F :

5'- TCGTXXXXXGAGTATCCGTCTXXXXTTCTCTATA -3'

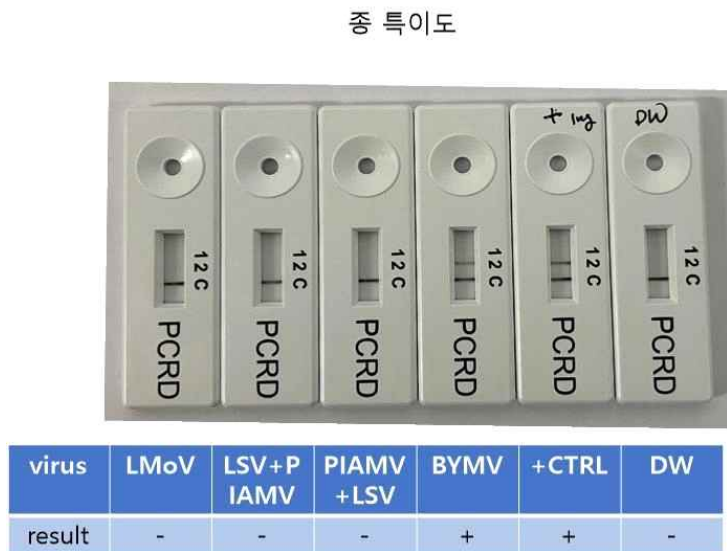
2. BYMVnfo - 9,412 P :

5'- [FAM] TCT XXX XXX TGG CGT TAC ATT ACT TAA TAC A
[THF]G ATT XXX XXX GTT TCA - 3' Spacer C

3. BYMVnfo - 9,498 R :

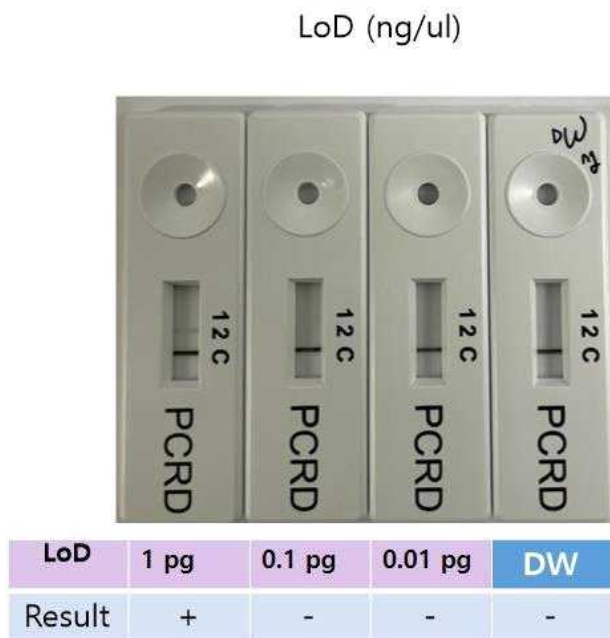
5'- [Biotin] GAGTAGAXXXXXGATACACATAXXXAATTTAAAA -3'

<그림 1-70> RT-RPA nfo primer probe set of BYMV.



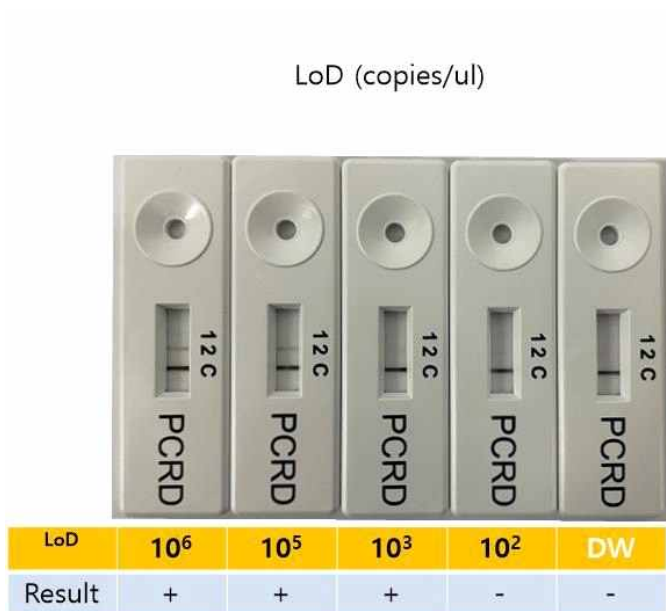
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMVnfo - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,412 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-71> BYMV RT-RPA nfo reaction with several related viruses.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMVnfo - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,412 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-72> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with BYMV primer and probe set.

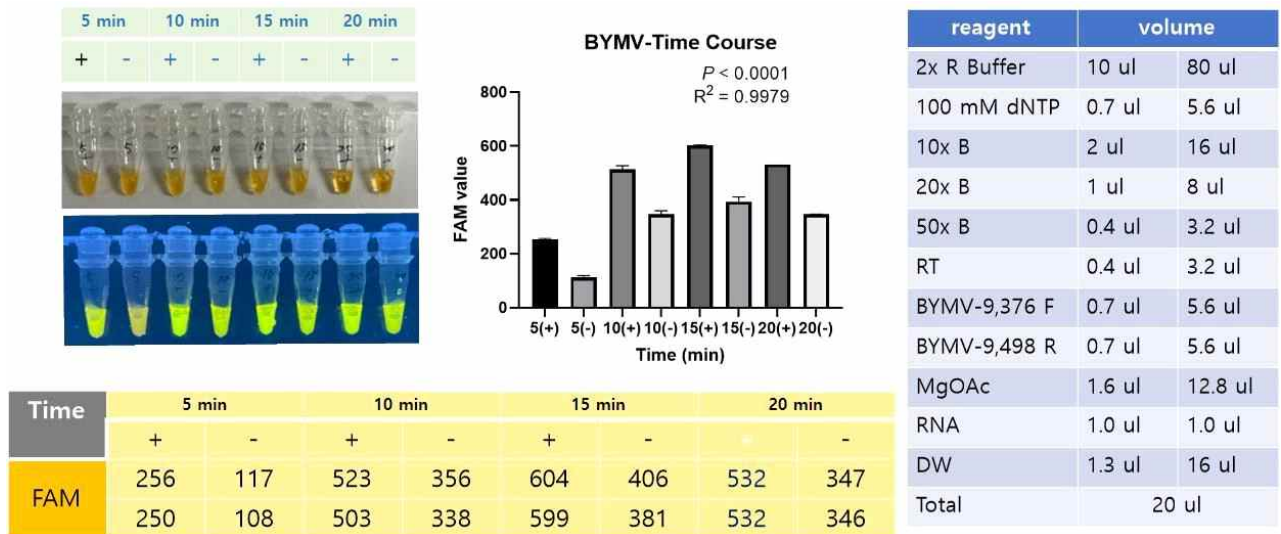


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMVnfo - 9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
BYMVnfo - 9,412 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

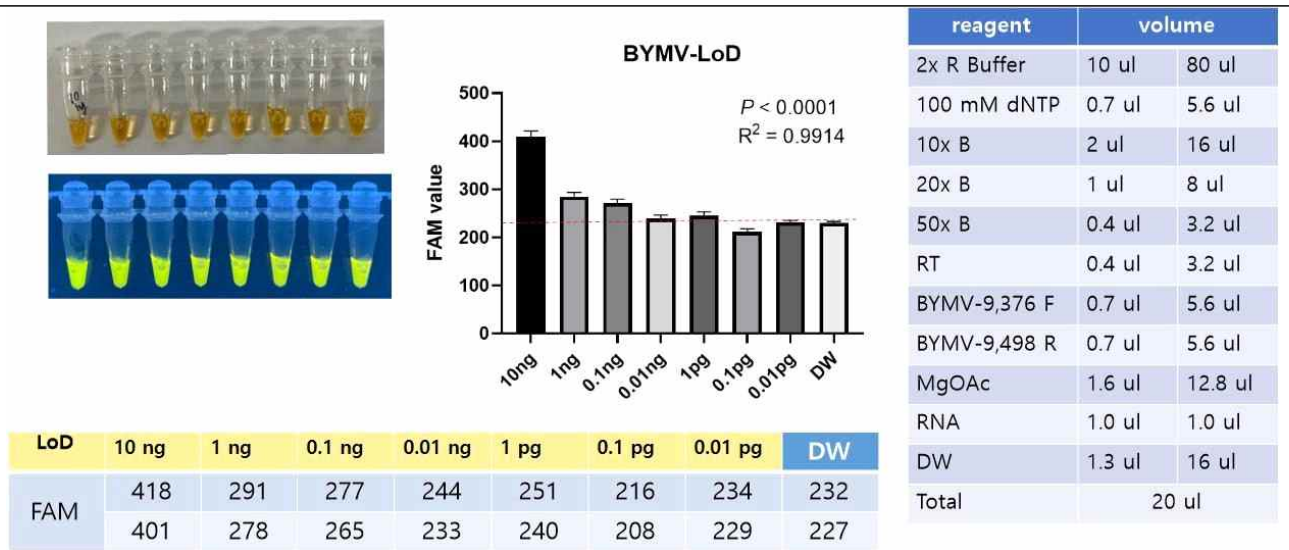
<그림 1-73> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with BYMV primer and probe set.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT BYMV primer & probe set를 응용하여 PCRD을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-70).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39℃에서 15분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- RPA nfo kit를 사용하여 다른 관련 바이러스들, Lily mottle virus (LMoV), Lily symptomless virus (LSV), Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Bean yellow mosaic virus (BYMV)와 교차반응을 조사한 결과, BYMV에 감염된 샘플에 잘 반응하였다 (그림 1-71).
- 검출한계는 1 pg, 1000 copies/ul까지 가능하였다 (그림 1-72, 73).

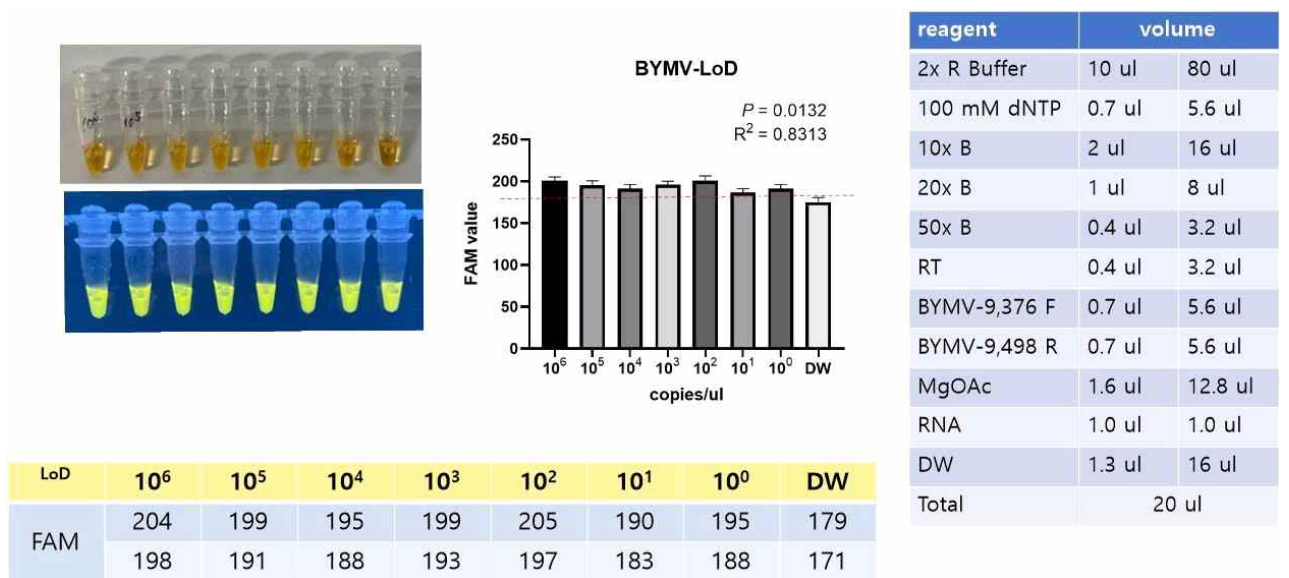
■ BYMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



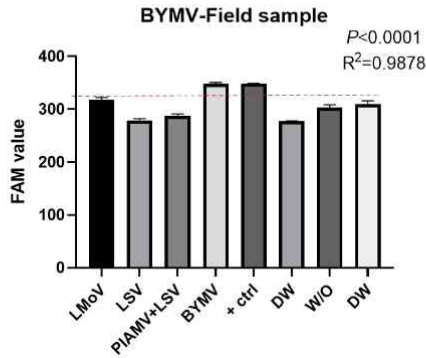
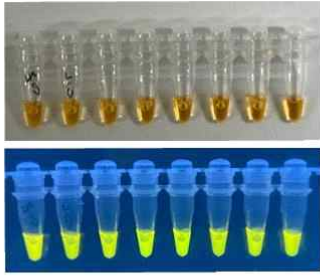
<그림 1-74> RT-RPA end point detection reaction of BYMV primer set according to the time.



<그림 1-75> LoD (ng/ul) of BYMV RT-RPA end point detection kit.



<그림 1-76> LoD (copies/ul) of BYMV RT-RPA end point detection kit.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
BYMV-9,376 F	0.7 ul	5.6 ul
BYMV-9,498 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

	LMoV	LSV	PIAM V+LSV	BYMV	+CTRL	DW	W/O	DW
FAM	321	281	290	350	349	278	307	314
	316	275	284	346	348	277	299	304

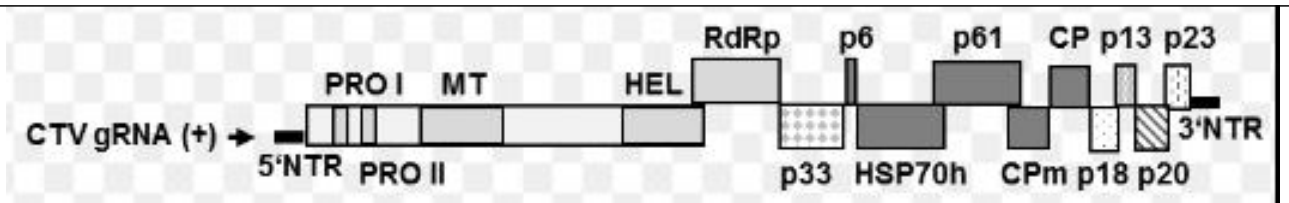
<그림 1-77> RT-RPA end point detection reaction of BYMV primer set with several viruses.

- 사이버그린을 이용한 BYMV end point detection kit는 반응 후 5분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-74).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-75).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 10분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-76).
- 4가지 관련바이러스 (Lily symptomless virus, Bean yellow mosaic virus, Plantago asiatica mosaic virus)와 RPA 반응을 시켜본 결과 BYMV 감염된 샘플과 잘 반응하였다 (그림 1-77).

5. Citrus tristeza virus (CTV) - RPA probe 진단제 개발



- Citrus tristeza 바이러스(CTV)는 이름을 딴 식물 속인 Citrus에 가장 경제적으로 피해를 주는 질병을 일으키는 Closterovirus 속의 바이러스 종입니다. 이 질병으로 인해 전 세계 수백만



그루의 감귤 나무가 죽었으며 수백만 그루가 생산에 쓸모 없게 되었습니다. 브라질과 다른 남미 국가의 농부들은 1930년대에 이 질병으로 인한 황폐화를 언급하면서 포르투갈어와 스페인어로 슬픔을 의미하는 "tristeza"라는 이름을 붙였습니다. 이 바이러스는 갈색 감귤류 진딧물에 의해 가장 효율적으로 전염됩니다.

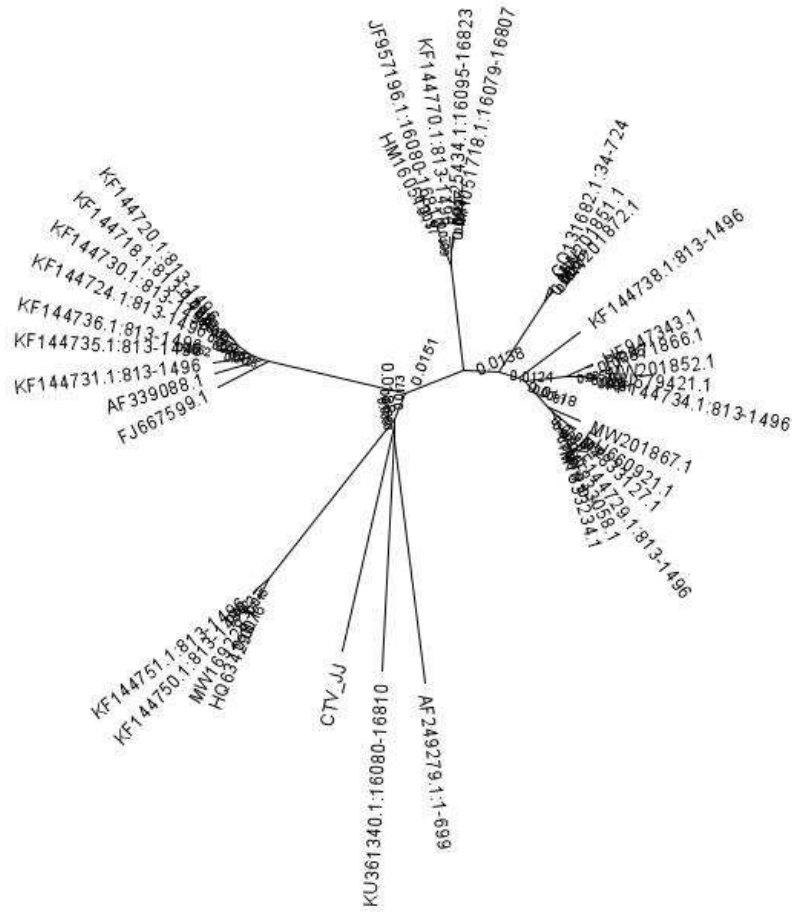
○ CTV는 길이가 2000nm이고 직경이 12nm인 유연한 로드 바이러스입니다. CTV 게놈은 일반적으로 길이가 19.2~19.3kb 사이이며 두 가지 유형의 캡시드 단백질로 둘러싸인 (+)-센스 RNA의 단일 가닥으로 구성됩니다. 게놈의 크기는 CTV를 알려진 가장 큰 RNA 바이러스 중 하나로 만듭니다. CTV 게놈은 적어도 17개의 단백질을 암호화할 수 있는 12개의 ORF를 포함합니다.

○ CTV는 숙주의 체관부 조직에 한정된 바이러스입니다. 그것은 수액을 추출하기 위해 체관부를 관통하는 벡터에 의해 반영구적으로 전파되며, 대부분은 작물에 서식하는 진딧물 종입니다. 갈색 감귤류 진딧물은 감귤류에 서식하는 다른 진딧물보다 바이러스를 옮기는 데 훨씬 효율적입니다. 플로리다에서는 1995년 이전에 갈색 감귤 진딧물이 도입되기 전에 주에서 발견된 가장 효율적인 벡터인 *Aphis gossypii*보다 6~25배 더 효율적인 것으로 나타났습니다. 이 효율성은 좁은 숙주 범위에 의해 향상됩니다. 갈색 감귤 진딧물과 새로운 성장을 식민지화하기 위해 날개 달린 형태를 만드는 경향. *A. gossypii*는 플로리다에 있는 수백 종의 식물을 포함하여 훨씬 더 넓은 숙주 범위를 가지고 있으며 다른 숙주를 먹을 때 바이러스의 전파가 차단됩니다.

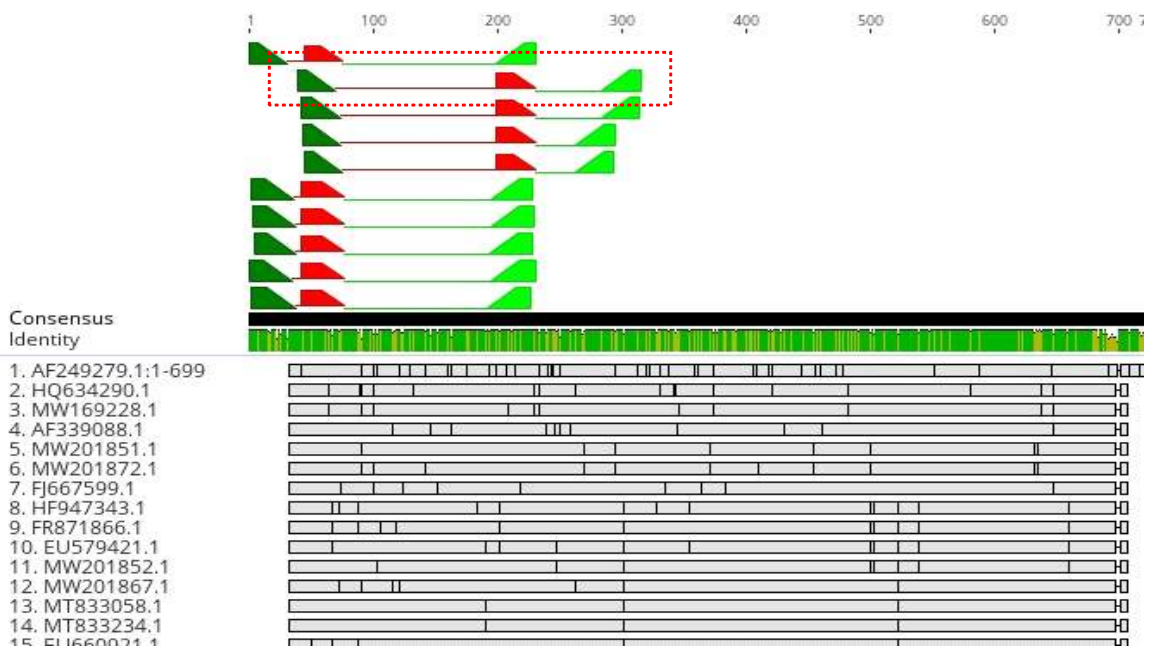
○ CTV는 경제적으로 가장 중요하고 감귤 나무에 피해를 주는 바이러스입니다. 신 오렌지 대목이 있는 나무를 죽일 뿐만 아니라 일반 감귤 나무의 줄기에 구멍을 내서 빠르게 퍼질 수 있고 피해를 입힐 수 있습니다. 1910년 이후 남아프리카, 1970년 이후 아르헨티나(1000만)와 브라질(600만), 1950년 이후 미국(300만)을 중심으로 전 세계적으로 8000만 그루 이상의 나무를 죽였습니다. 중앙 아메리카와 미국에서는 그 영향이 극적으로 증가했습니다. 스페인에서는 4천만 그루가 넘는 스위트 오렌지와 만다린 나무의 생산량이 점진적으로 감소했습니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Citrus_tristeza_virus).

Accession	92.6%	93.0%	93.2%	93.6%	93.8%	94.1%	94.2%	94.3%	94.4%	94.5%	94.6%	94.7%	94.8%	94.9%	95.0%	95.1%	95.2%	95.3%	95.4%	95.5%	95.6%	95.7%	95.8%	95.9%	96.0%	96.1%	96.2%	96.3%	96.4%	96.5%	96.6%	96.7%	96.8%	96.9%	97.0%	97.1%	97.2%	97.3%	97.4%	97.5%	97.6%	97.7%	97.8%	97.9%	98.0%	98.1%	98.2%	98.3%	98.4%	98.5%	98.6%	98.7%	98.8%	98.9%	99.0%	99.1%	99.2%	99.3%	99.4%	99.5%	99.6%	99.7%	99.8%	99.9%	100.0%
AF492376.1-1699	92.6%	93.0%	93.2%	93.6%	93.8%	94.1%	94.2%	94.3%	94.4%	94.5%	94.6%	94.7%	94.8%	94.9%	95.0%	95.1%	95.2%	95.3%	95.4%	95.5%	95.6%	95.7%	95.8%	95.9%	96.0%	96.1%	96.2%	96.3%	96.4%	96.5%	96.6%	96.7%	96.8%	96.9%	97.0%	97.1%	97.2%	97.3%	97.4%	97.5%	97.6%	97.7%	97.8%	97.9%	98.0%	98.1%	98.2%	98.3%	98.4%	98.5%	98.6%	98.7%	98.8%	98.9%	99.0%	99.1%	99.2%	99.3%	99.4%	99.5%	99.6%	99.7%	99.8%	99.9%	100.0%

<그림 1-78> Homology distance of 36 cases of CTV isolates.



<그림 1-79> Phylogenetic tree of 36 cases of CTV isolates.



<그림 1-80> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 36 cases of CTV isolates.

1. CTV - 40 F :

5'- ACGAAXXXXAAATTGAAGAAXXXXAAACAA -3'

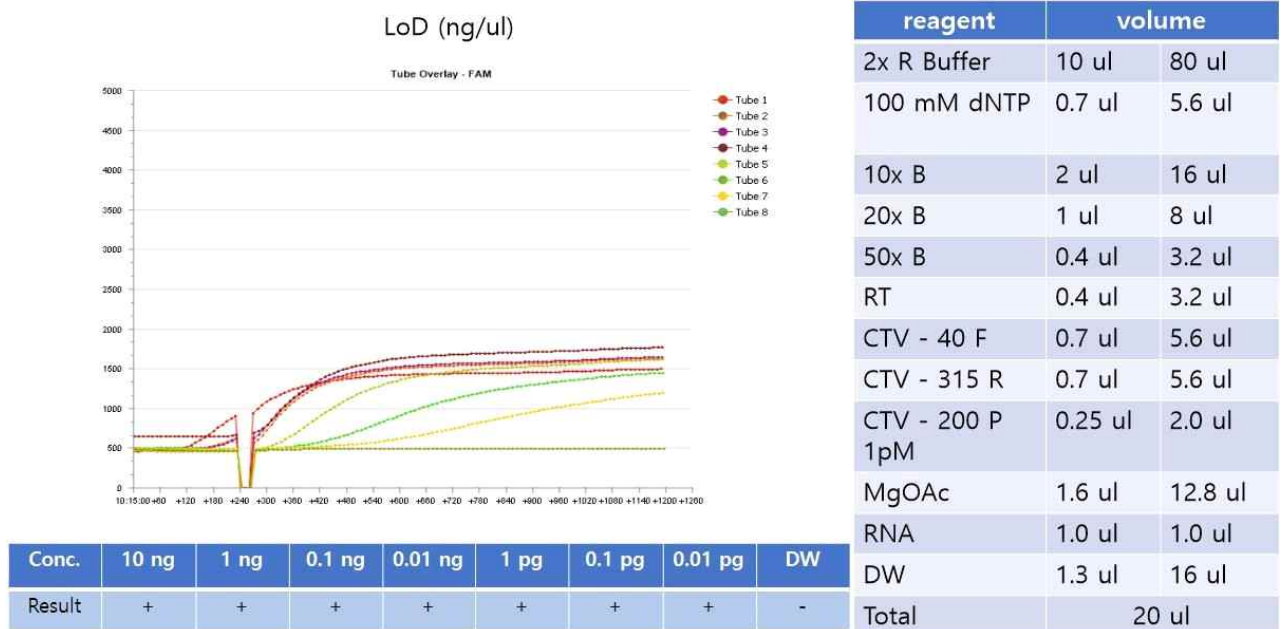
2. CTV - 200 P :

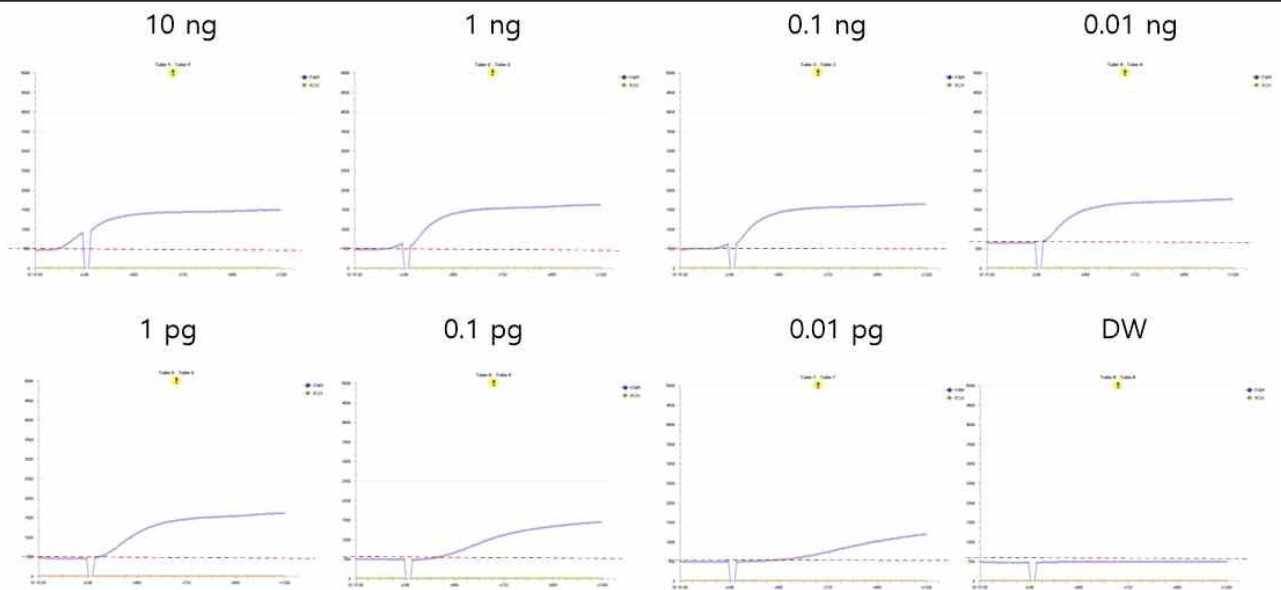
5'- CAA CAG XXX XXX GCT TTA AAC AGA GAC TTA[FAM-dT]T[THF]C
[BHQ1-dT] TAC TTT XXX XXX GAA -3' Spacer C

3. CTV - 315 R :

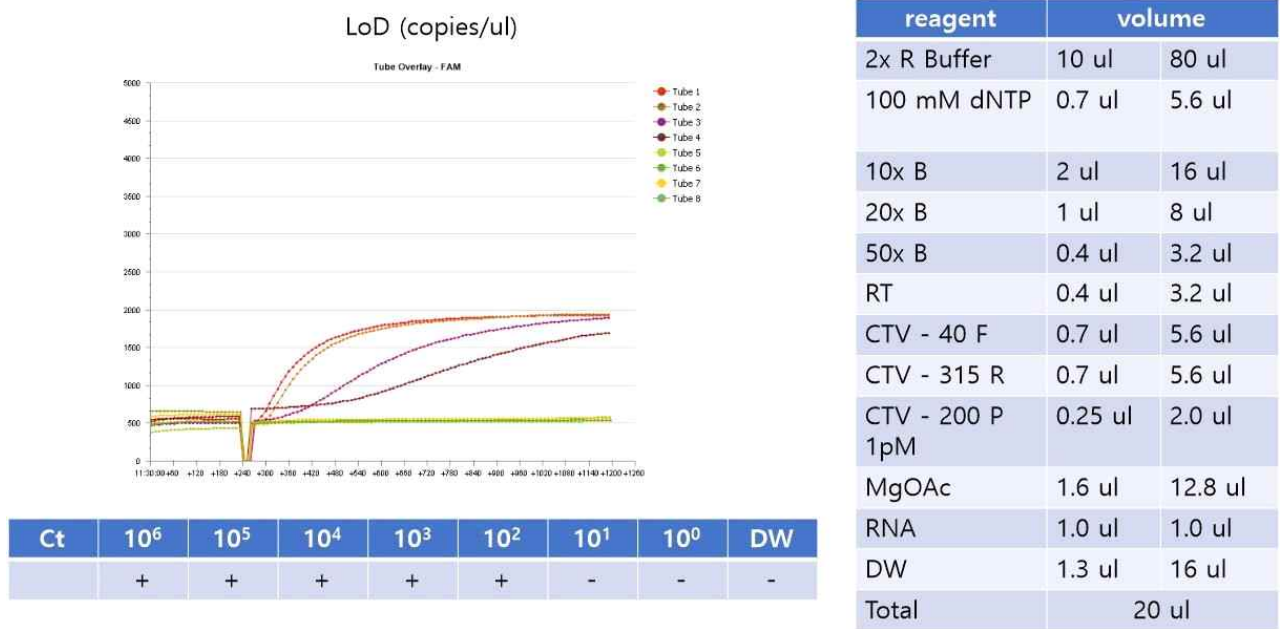
5'- GTAATXXXXACTCTTAACTXXXACGATA -3'

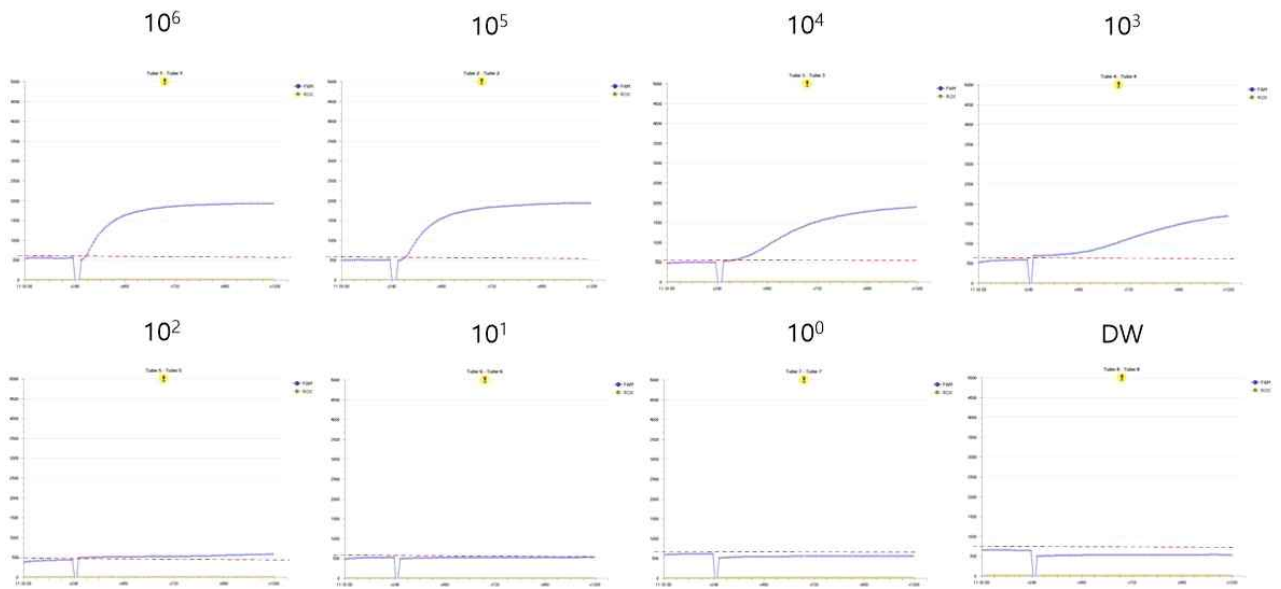
<그림 1-81> RPA exo primer and probe set of 36 cases of CTV isolates.



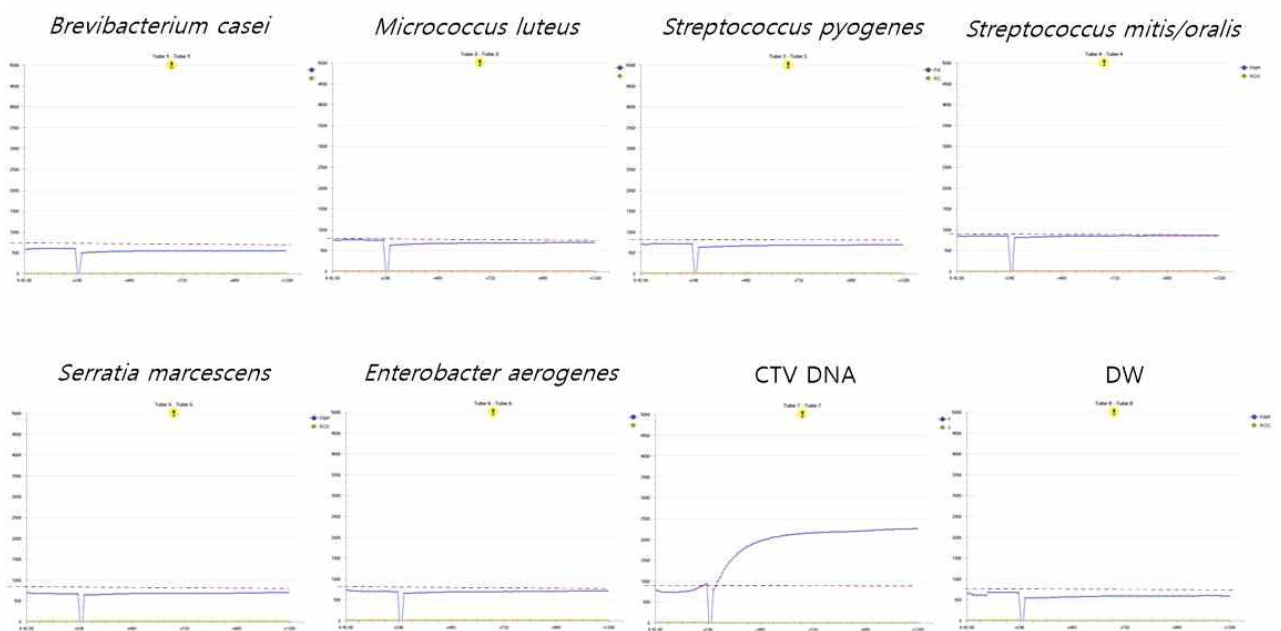


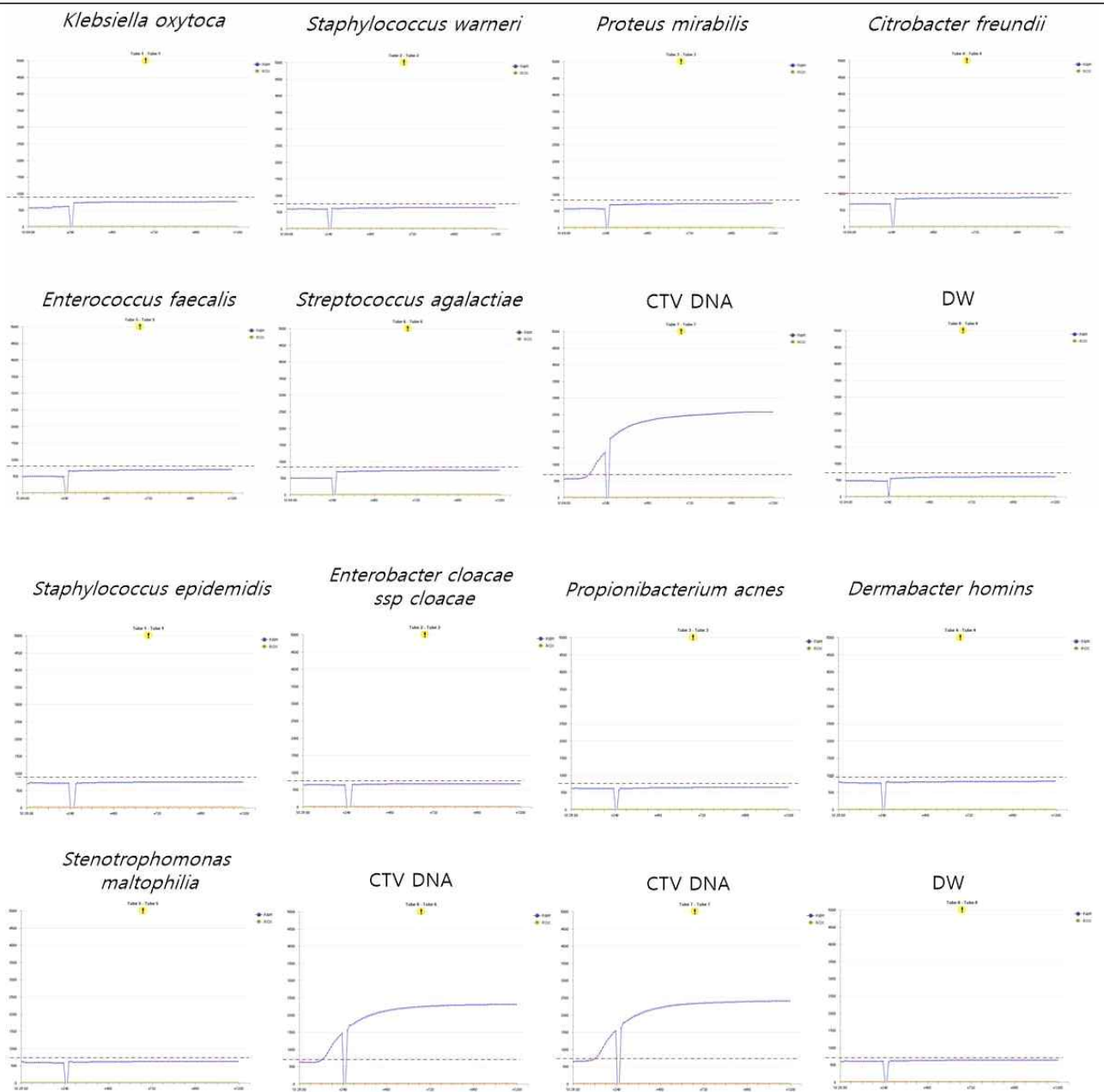
<그림 1-82> Limitation of Detection (ng/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of CTV.



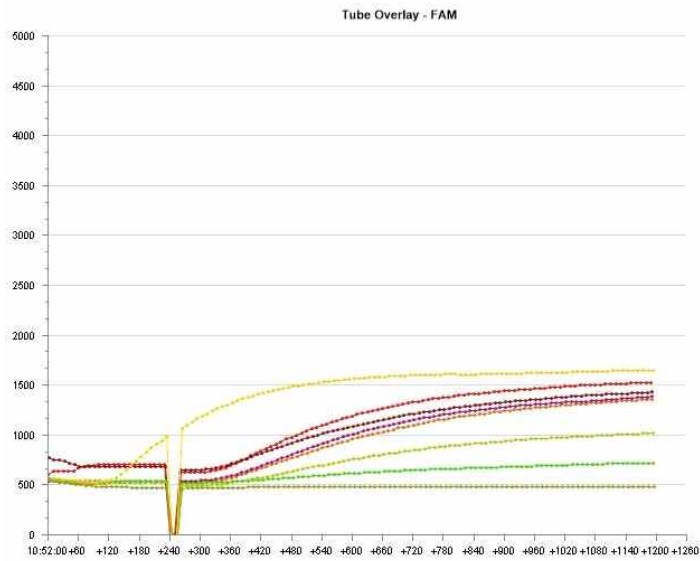


<그림 1-83> Limitation of Detection (copies/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of CTV.



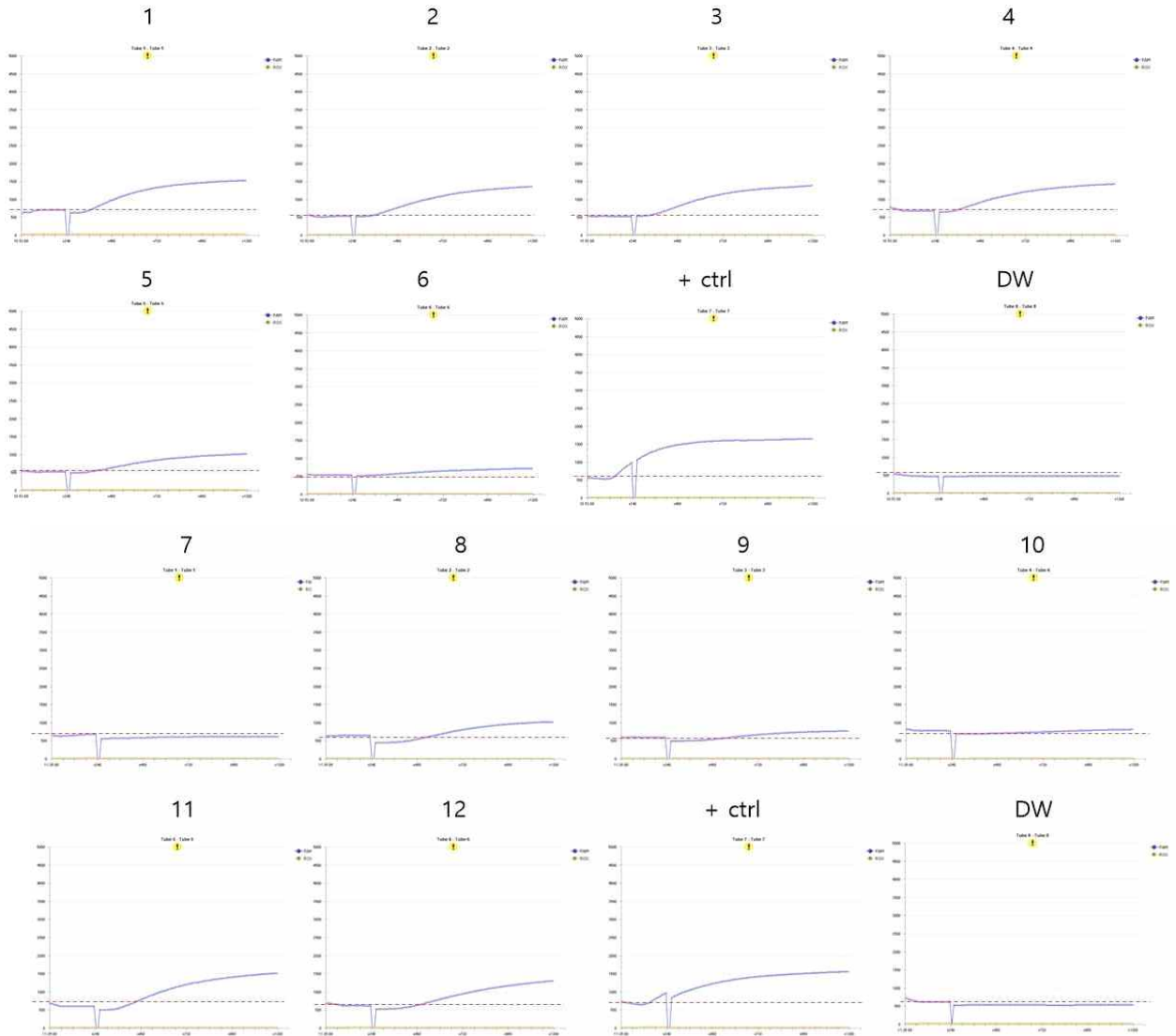


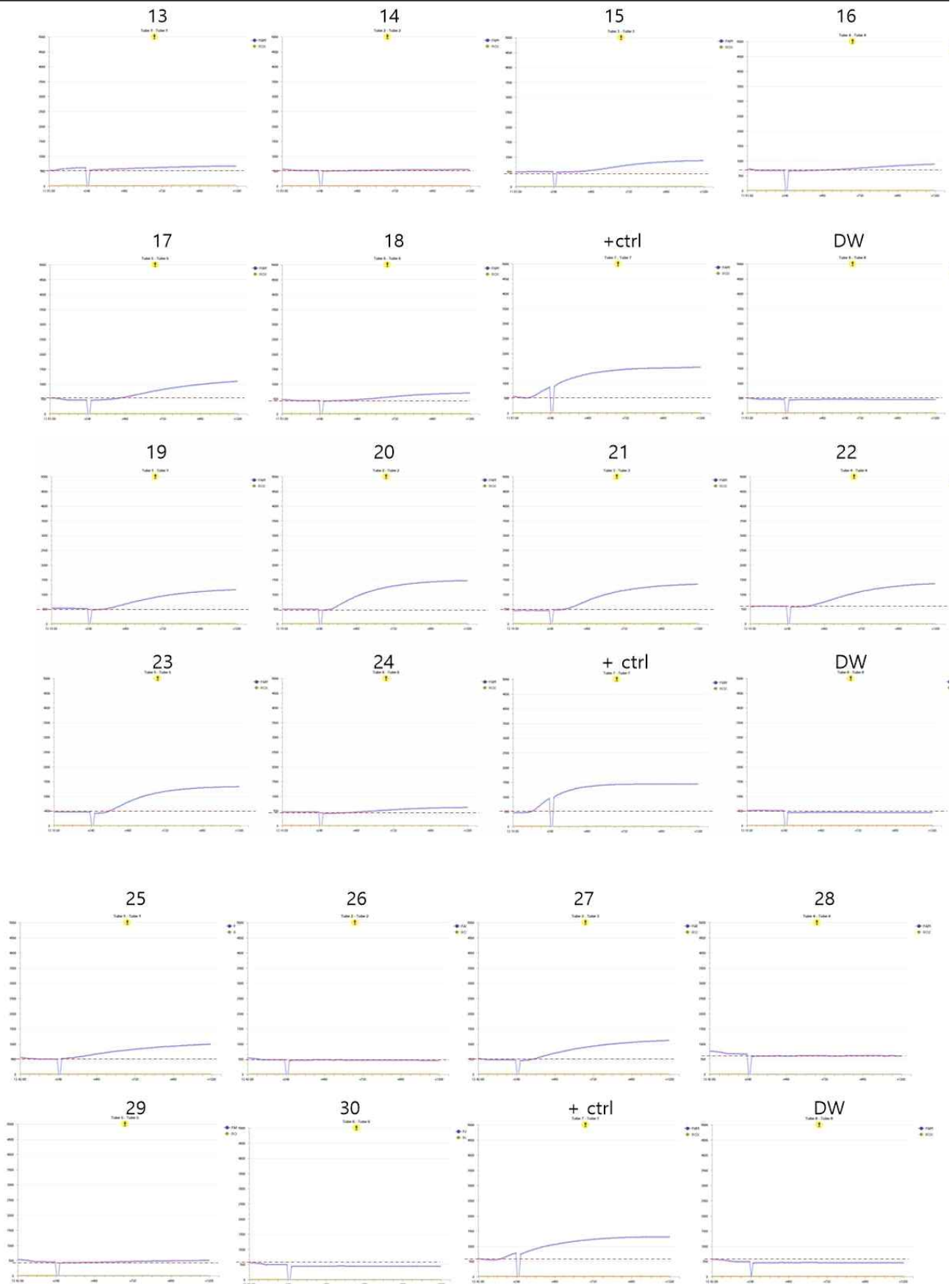
<그림 1-84> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of CTV with several bacteria.



민감도 = 25/27 = 92.6%

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTV - 40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 315 R	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 200 P	0.25 ul	2.0 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	2.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	





<그림 1-85> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of CTV with field samples.

Table 1. RPA Exo-RT reaction of CTV infected field samples.

No.1	1	2	3	4	5	6	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
No.2	7	8	9	10	11	12	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	-	+	+	+w	+	+	+	-
No.3	13	14	15	16	17	18	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+w	-	+	+	+	+	+	-
No.4	19	20	21	22	23	24	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
No.5	25	26	27	28	29	30	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	-	+	-	+	-		
Exo-RPA	+	-	+	-	+w	-	+	-

- CTV isolates 15건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 네 개의 그룹으로 나누어지고 있었으나 분리주 간에 크게는 11%까지의 변이가 관찰되었다 (그림 1-78, 79).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3' 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; CTV-40F, CTV-200P, CTV-315R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-80, 81).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-82).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-83).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 CTV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-84).
- RT-RPA CTV detection kit의 민감도를 알아보기 위하여 30개의 샘플을 준비하여 RT-PCR를 수행한 결과, 27건이 양성이었고 3건이 음성이었다. 3건의 음성 샘플은 RT-RPA CTV detection kit에서도 음성으로 판정되었다. RT-RPA CTV detection kit는 27건의 RT-PCR 양성 샘플에 대하여서는 25건이 양성이었다. 그러므로 RT-RPA CTV detection kit의 민감도는 92.6% (25/27)였다 (그림 1-85, Table 1).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-85).

- 이상의 결과로 RT-RPA CTV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-86, 87).
- 엘씨엠사이언스 홈페이지에 등록하여 시판을 실시하였다 (그림 1-88).



<그림 1-86> CTV ER detection kit.

Revision No.: LCM-CTV-ER-0001
 Issue Date: Jul 03, 2023
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
 Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
 161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.
 Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
 Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of CTV gene to detect the CTV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Citrus tristeza virus (CTV) is a viral species of the genus Closterovirus that causes the most economically damaging disease to its namesake plant genus, Citrus. The disease has led to the death of millions of Citrus trees all over the world and has rendered millions of others useless for production. Farmers in Brazil and other South American countries gave it the name "tristeza", meaning sadness in Portuguese and Spanish, referring to the devastation produced by the disease in the 1930s. The virus is transmitted most efficiently by the brown citrus aphid.

CTV is a flexuous rod virus with dimensions of 2000 nm long and 12 nm in diameter. The CTV genome is typically between 19.2 and 19.3 kb long and consists of a single strand of (+)-sense RNA enclosed by two types of capsid proteins. The size of its genome makes CTV one of the largest RNA viruses known. The CTV genome contains 12 open reading frames, which could encode at least 17 proteins.

CTV is a virus that is limited to the phloem tissues of its host. It is transmitted semi-persistently by vectors that penetrate the phloem to extract sap, mostly the aphid species that colonize the crop. The brown citrus aphid is considerably more efficient at transmitting the virus than are other aphids that infest citrus. In Florida, it has been shown to be from six to twenty five times as efficient as *Aphis gossypii*, the most efficient vector found in the state before the introduction of the brown citrus aphid prior to 1995. This efficiency is enhanced by the narrow host range of the brown citrus aphid and its tendency to produce winged forms in order to colonize new growth. *A. gossypii* has a much wider host range, including hundreds of plant species in Florida, and the transmission of the virus is blocked when it feeds on a different host.

The Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Citrus tristeza virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the CTV gene for the unique amplification of Citrus tristeza virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	CTV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	CTV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	CTV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	CTV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
 Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipettes (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	CTV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	CTV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	CTV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- 1) Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- 2) Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- 3) Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- 4) Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 * It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- 5) Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- 6) Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- 7) Set the program as below table.

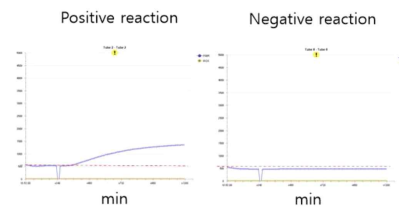
Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 * Unknown: clinical sample
 * Negative control
 * Positive control

8. Reading the Result

Exp. example



<Example of CTV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	CTV RNA	Interpretation
1	+	-	+	CTV Positive
2	+	-	-	CTV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- 1) For research use only.
- 2) Carefully read this instruction before starting the procedure.
- 3) Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- 4) Do not use the kit after its expiration date written on box.
- 5) Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- 6) Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- 7) Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- 8) Use always sterile pipette tips with filters.
- 9) Wear separate coats and gloves in each area.
- 10) Collected test samples in sterile tubes.
- 11) Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.



Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit

₩ 600,000

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd. 에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 CTV를 검출하는 분자진단제입니다.

+ 1 -

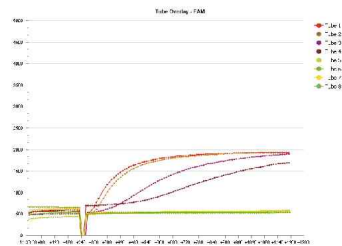
600,000원

바로구매 장바구니

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit

Research use only

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit 는 감염된 작물로부터 CTV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.



Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit*Research use only*

제품스펙	주문정보	관련제품
------	------	------

사용목적

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit 는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 CTV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit*Research use only***제품스펙**

검체	CTV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
민감도	10 ² copies/ul
특이도	100%
보관온도	-20°C

Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit*Research use only***주문정보**

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-CTV-ER-50	Citrus tristeza virus (CTV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

<그림 1-88> CTV ER Detection kit in LCM science Homepage.

■ CTV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. CTVnfo - 40 F :

5'- ACGAXXXAGAAATTGAAXXXAAAACAA -3'

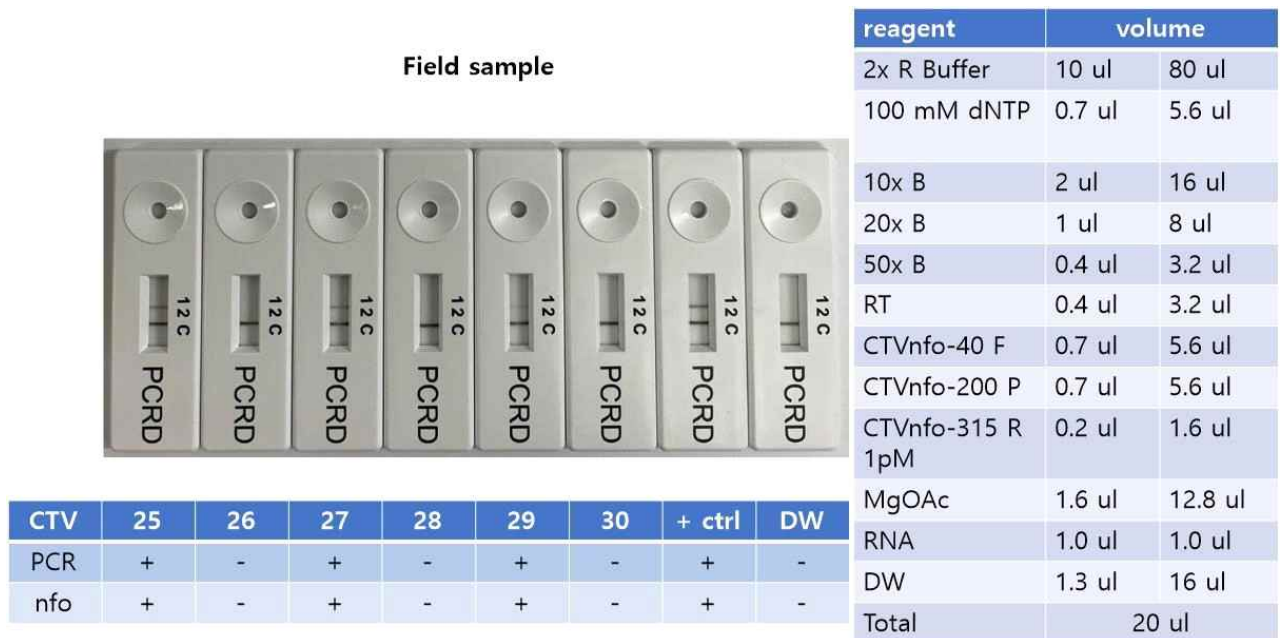
2. CTVnfo - 200 P :

5'- [FAM]CAA XXX XXX GCT GCT TTA AAC AGA GAC TTA TT[THF] C
T TAC TTT XXX XXX GAA -3' Spacer C

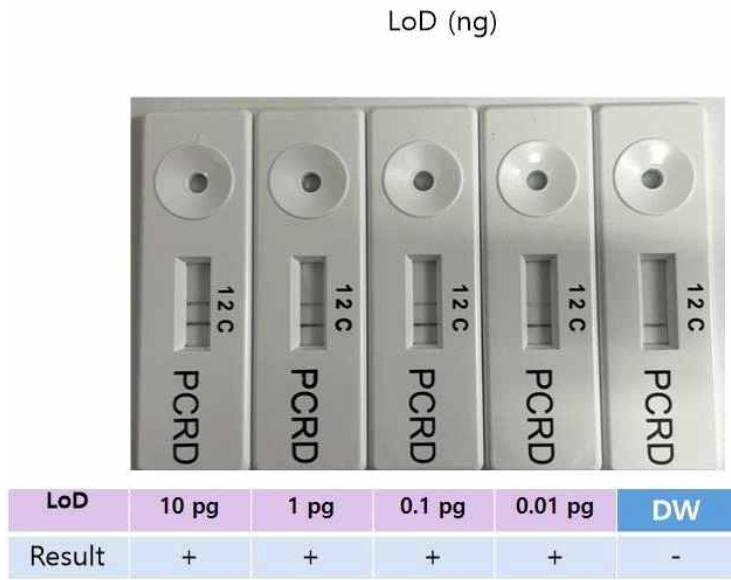
3. CTVnfo - 315 R :

5'- [Biotin] GTAAXXTGAACTCTTXXXTGCTAAACGATA -3'

<그림 1-89> RT-RPA nfo primer probe set of CTV.

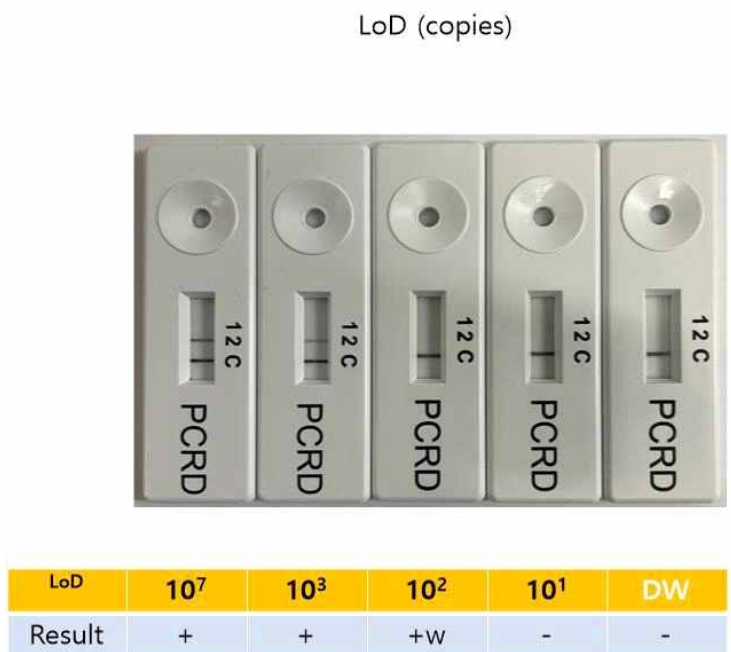


<그림 1-90> CTV RT-RPA nfo reaction with filed samples.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTVnfo-40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTVnfo-200 P	0.7 ul	5.6 ul
CTVnfo-315 R	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-91> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with CTV primer and probe set.

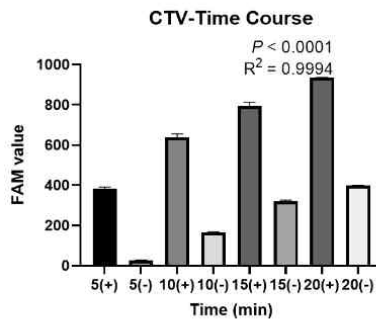
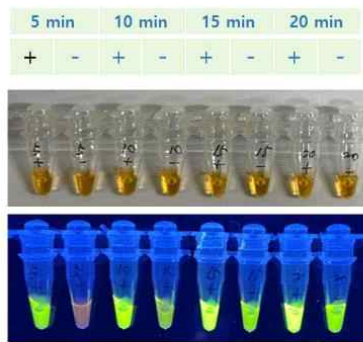


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTVnfo-40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTVnfo-200 P	0.7 ul	5.6 ul
CTVnfo-315 R	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-92> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with CTV primer and probe set.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT BYMV primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-89).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-90).
- RPA nfo kit를 사용하여 field에서 수집한 샘플을 이용하여 RNA를 분리한 후 CTV nfo primer probe와 반응을 시켜서 RT-PCR결과와 비교해 본 결과 감염된 샘플과 잘 반응하였다 (그림 1-90).
- 검출한계는 0.01 pg, 100 copies/ul까지 가능하였다 (그림 1-91, 92).

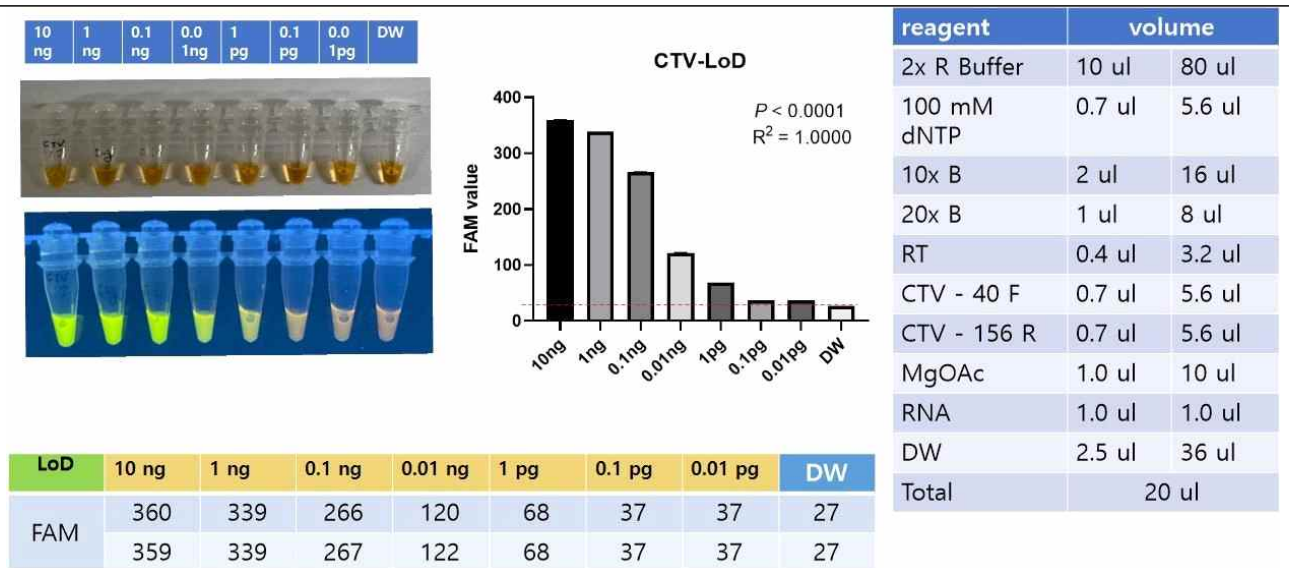
■ CTV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



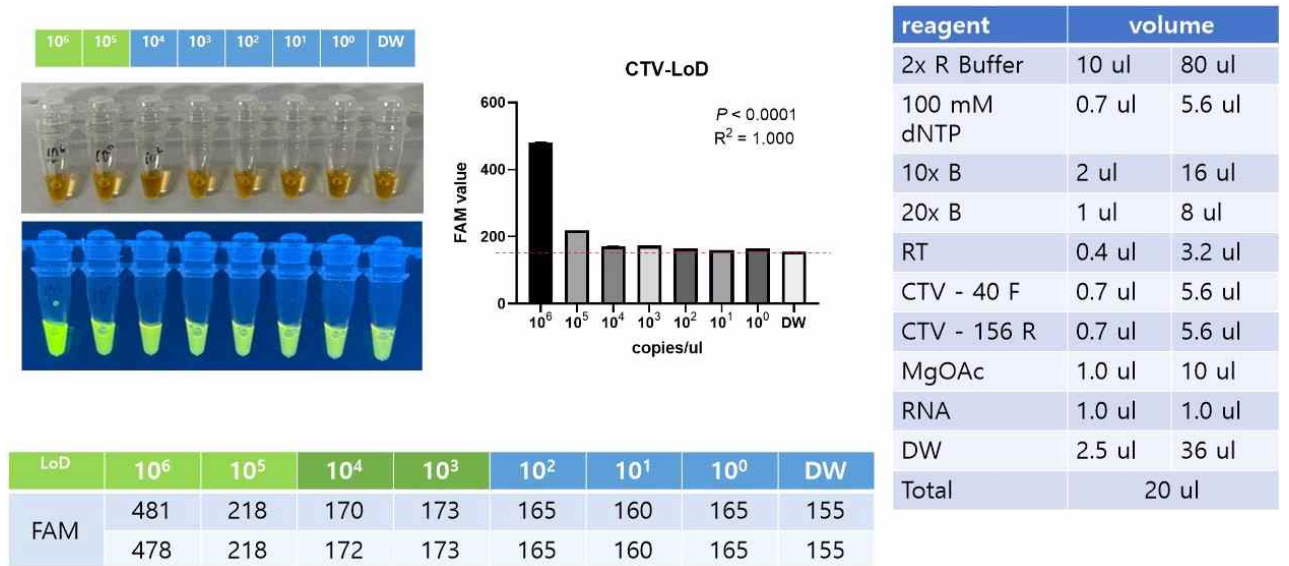
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTV - 40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 156 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.0 ul	10 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	2.5 ul	36 ul
Total	20 ul	

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	388	28	650	167	807	324	936	398
	378	25	625	163	780	314	934	400

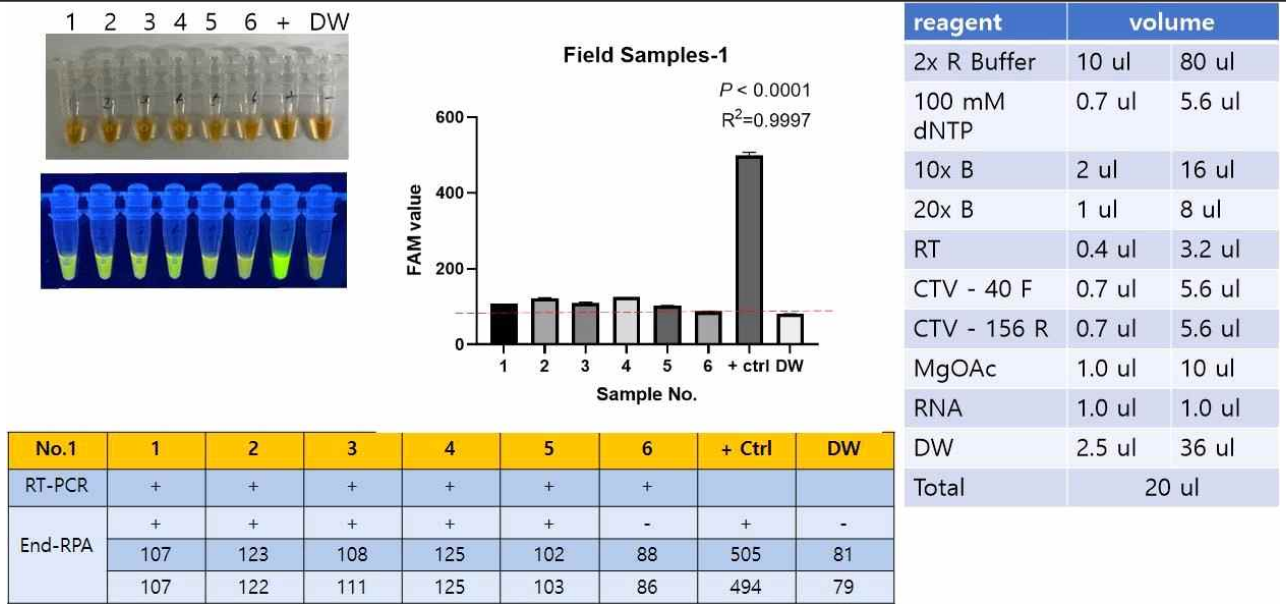
<그림 1-93> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set according to the time.



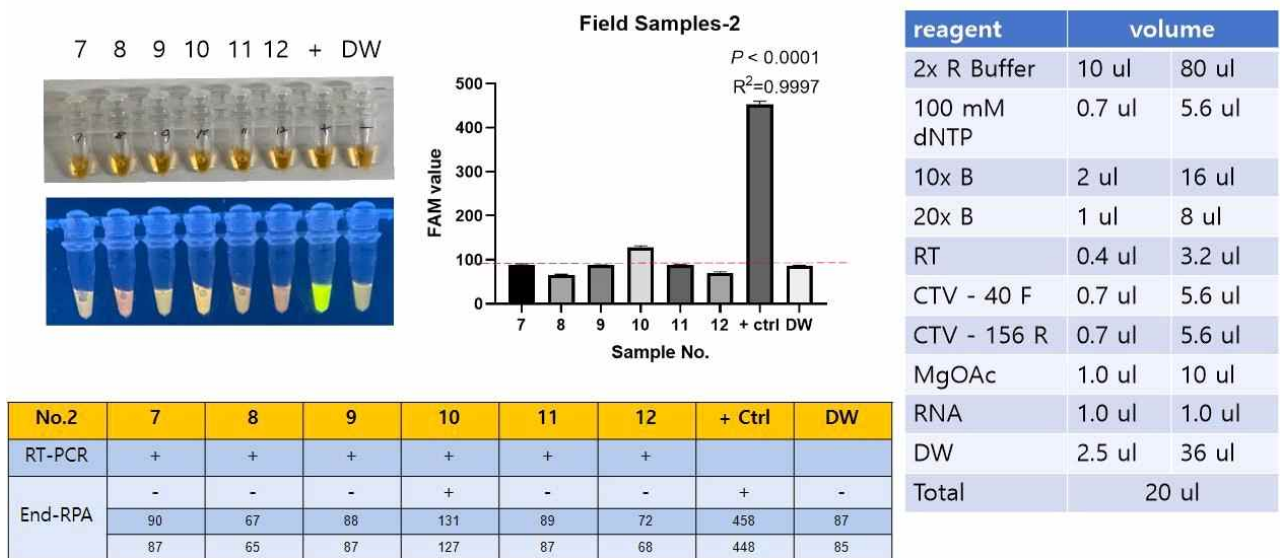
<그림 1-94> LoD (ng/ul) of CTV RT-RPA end point detection kit.



<그림 1-95> LoD (copies/ul) of CTV RT-RPA end point detection kit.

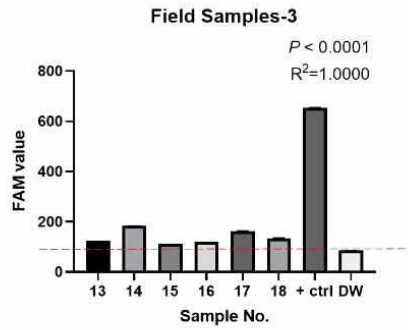
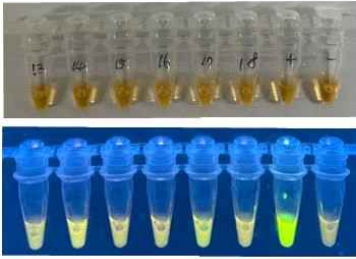


<그림 1-96> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set with field samples-I.



<그림 1-97> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set with field samples-II.

13 14 15 16 17 18 + DW

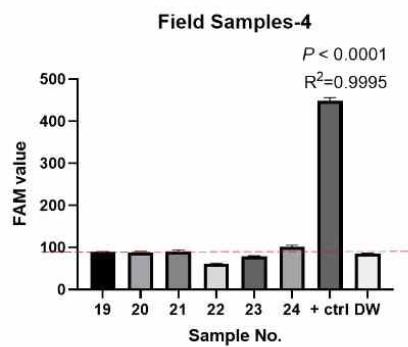
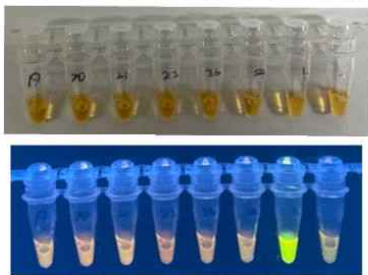


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTV - 40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 156 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.0 ul	10 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	2.5 ul	36 ul
Total	20 ul	

No.2	13	14	15	16	17	18	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
	124	184	112	119	161	136	654	85
	124	183	112	119	164	134	655	86

<그림 1-98> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set with field samples-III.

19 20 21 22 23 24 + DW

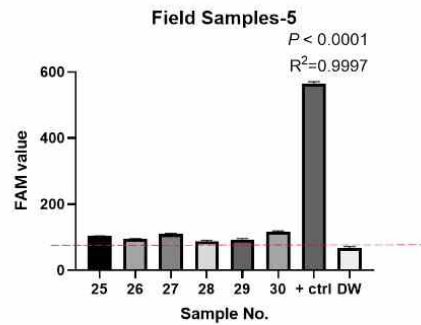
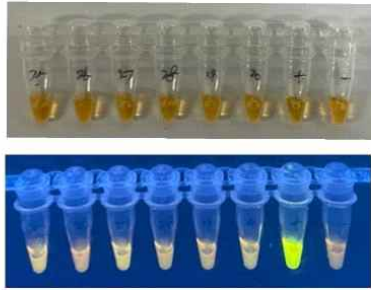


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTV - 40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 156 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.0 ul	10 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	2.5 ul	36 ul
Total	20 ul	

No.2	19	20	21	22	23	24	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	-	-	-	-	-	+	+	-
	89	90	93	62	80	104	454	86
	90	86	87	59	78	99	442	83

<그림 1-99> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set with field samples-IV.

25 26 27 28 29 30 + DW



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
CTV - 40 F	0.7 ul	5.6 ul
CTV - 156 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.0 ul	10 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	2.5 ul	36 ul
Total	20 ul	

No.2	25	26	27	28	29	30	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	-	+	-	+	-		
End-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
	103	95	111	90	95	118	569	65
	104	92	108	85	91	112	560	70

<그림 1-100> RT-RPA end point detection reaction of CTV primer set with field samples-V.

Table 2. RPA end point detection reaction of CTV infected field samples

No.1	1	2	3	4	5	6	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	+	+	+	+	+	-	+	-

No.2	7	8	9	10	11	12	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	-	-	-	+	-	-	+	-

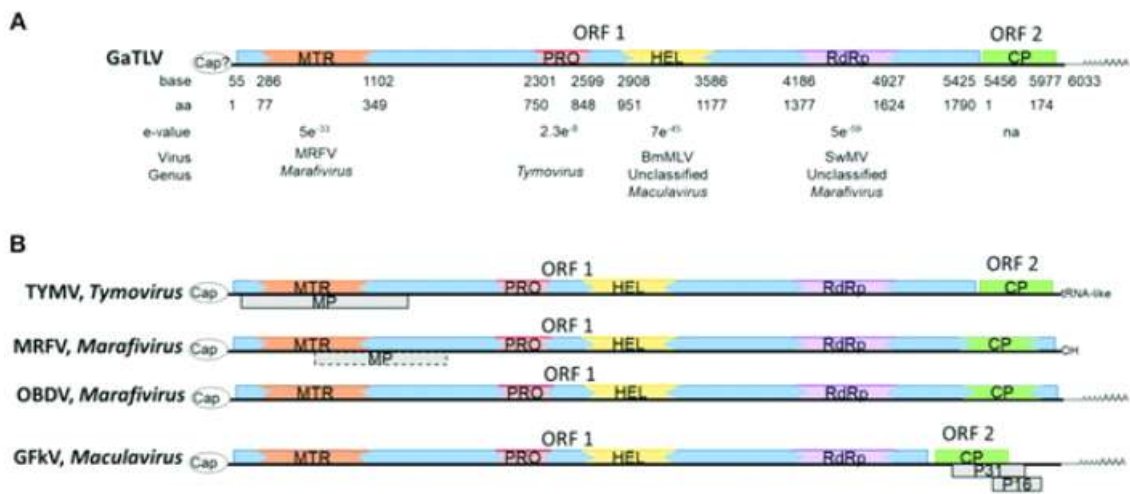
No.3	13	14	15	16	17	18	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-

No.4	19	20	21	22	23	24	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	-	-	-	-	-	+	+	-

No.5	25	26	27	28	29	30	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	-	+	-	+	-		
End-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-

- 사이버그린을 이용한 CTV end point detection kit는 반응 후 5분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-93).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 10분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-94).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 10분간 반응시킨 결과, 1000 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-95).
- RT-RPA CTV end point detection kit의 민감도를 알아보기 위하여 30개의 샘플을 준비하여 RT-PCR를 수행한 결과, 27건이 양성되었고 3건이 음성이었다. 3건의 음성 샘플은 RT-RPA CTV end point detection kit에서 양성으로 판정되었다. RT-RPA CTV end point detection kit는 27건의 RT-PCR 양성 샘플에 대하여서는 16건이 양성이었다. 그러므로 RT-RPA CTV end point detection kit의 민감도는 59.3% (16/27)였다 (그림 1-96, 97, 98, 99, 100, Table 2).
- RT-RPA CTV end point detection kit는 특이도와 민감도가 낮아서 현장에서 사용하기에는 부적당한 것으로 사료된다.

6. Grapevine fleck virus (GFkV) - RPA probe 진단제 개발

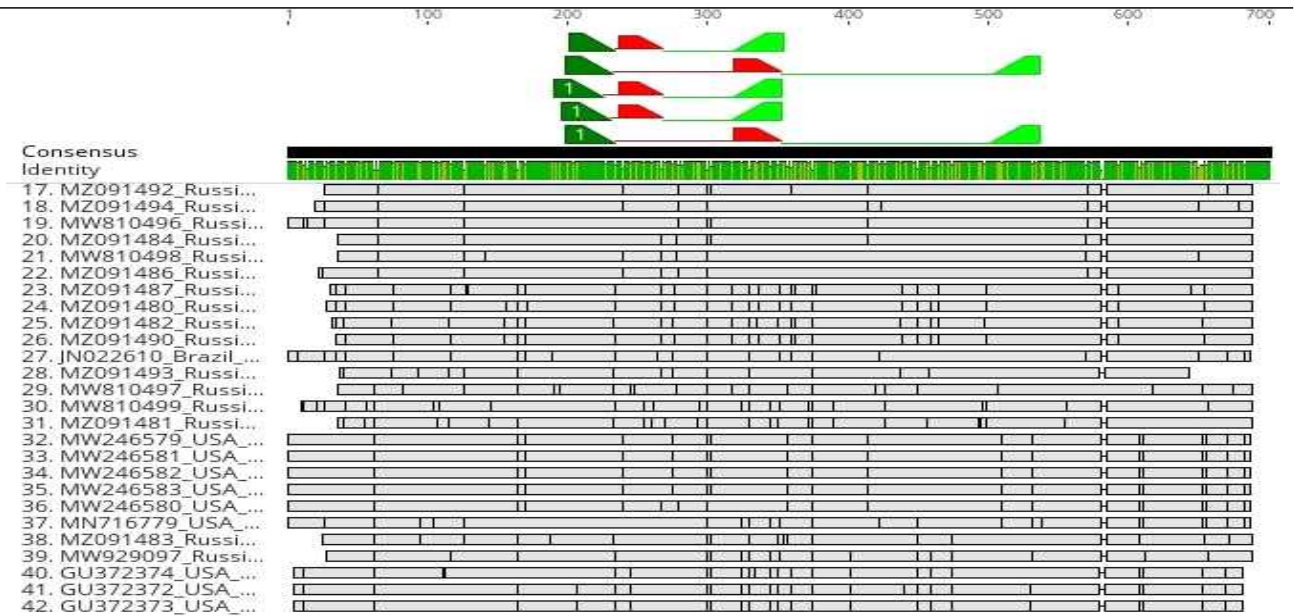


Grapevine fleck virus, GFkV (7,564 nts)



○ 포도덩굴 반점 바이러스(GFkV), 포도나무 레드 글로브 바이러스(GRGV), 포도나무 루페스트리스 정맥 깃털 바이러스(GRVFV), 포도나무 소행성 모자이크 관련 바이러스(GAMaV) 및 포도나무 시라 바이러스 1(GSyV-1)은 진화적으로 관련된 그룹입니다. 형태학적, 물리화학적, 분자적 특성이 유사한 바이러스. GFkV는 반점병의 원인균이며 GAGV는 소행성모자이크병, GRVFV는 각각 소행성모자이크병, GRVFV는 특정 증상에 관여하지 않는다.

○ GSyV-1은 네 가지 바이러스와 많은 특성을 공유하지만 아직 특정 증후군과 관련이 없습니다. 이 모든 바이러스는 체관부 제한적이고 기계적으로 전염되지 않으며 주로 감염된 전파 물질을 통해 퍼집니다. GFkV는 어디에나 존재하는 반면 다른 바이러스는 특정 지리적 영역에서만 보고



<그림 1-103> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 45 cases of GFkV isolates.

1. GFkV - 191 F :

5'- TAAGXXXXXCACCTCCCCTTCXXXXCCTGTGGTAT -3'

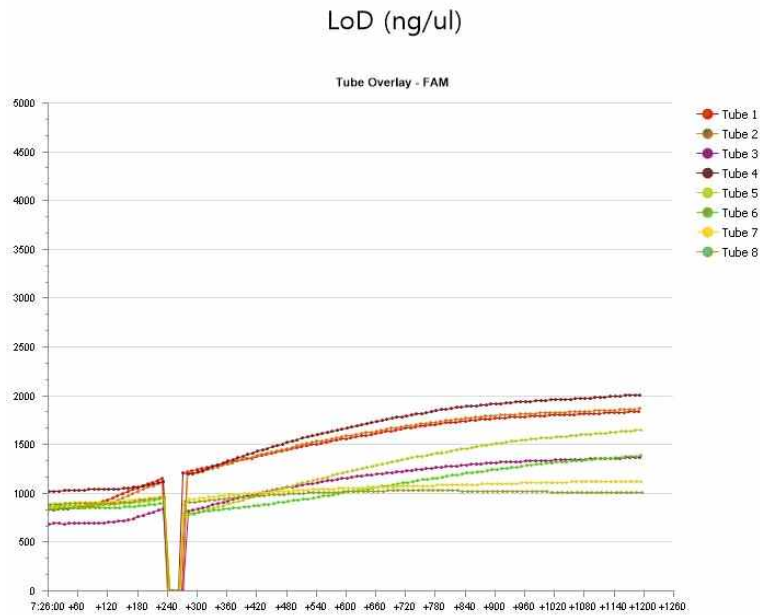
2. GFkV - 237 P :

5'- TTC CTG XXX XXX GAC ATC ACG GGC ACC GAG[FAM-dT]CC[THF]CC[BHQ1-dT]
ACA CCT XXX XXX CCA TC-3' Spacer C

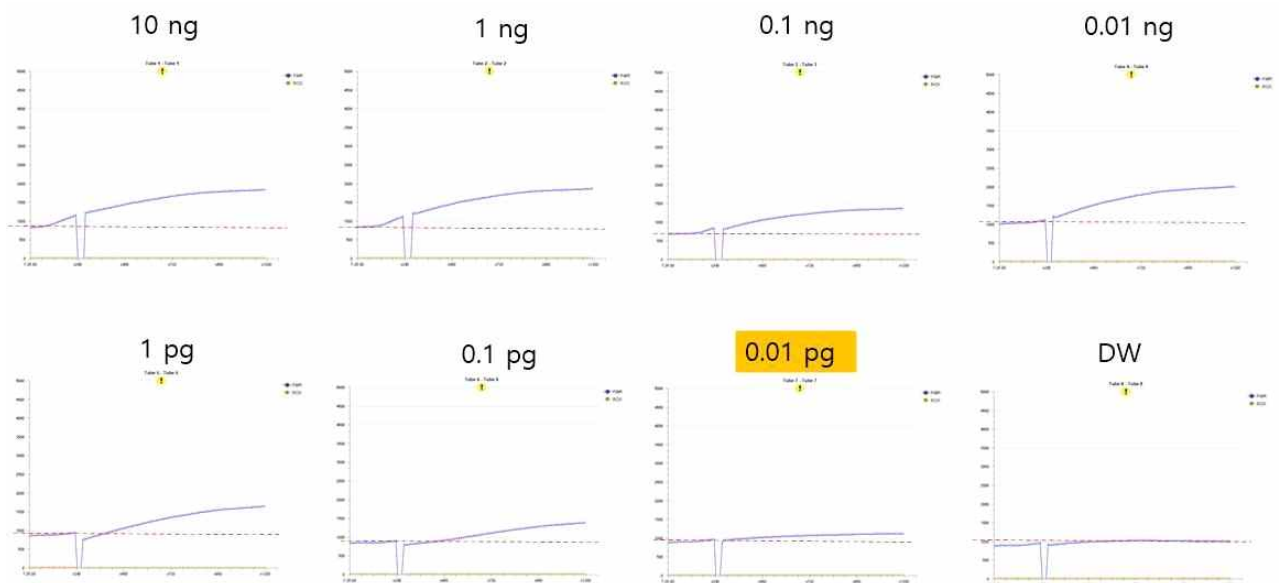
3. GFkV - 352 R :

5'- CAGTGGXXXGGACGAAGGCTTCAXXXXGGTGAG-3'

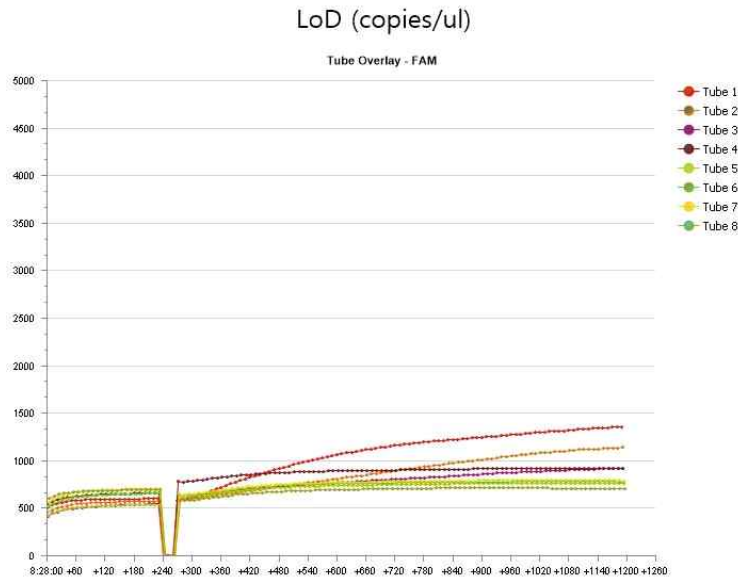
<그림 1-104> RPA exo primer and probe set of 45 cases of GFkV isolates.



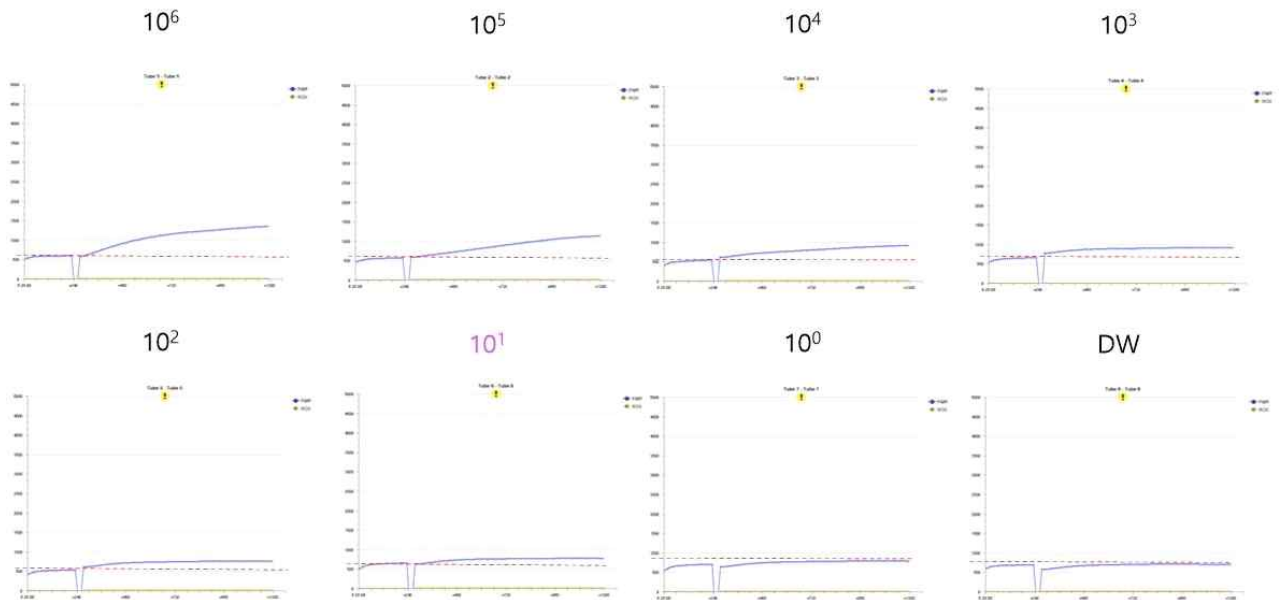
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GfKV - 191 F	0.7 ul	5.6 ul
GfKV - 352 R	0.7 ul	5.6 ul
GfKV - 237 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	



<그림 1-105> Limitation of Detection (ng/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of GfKV.

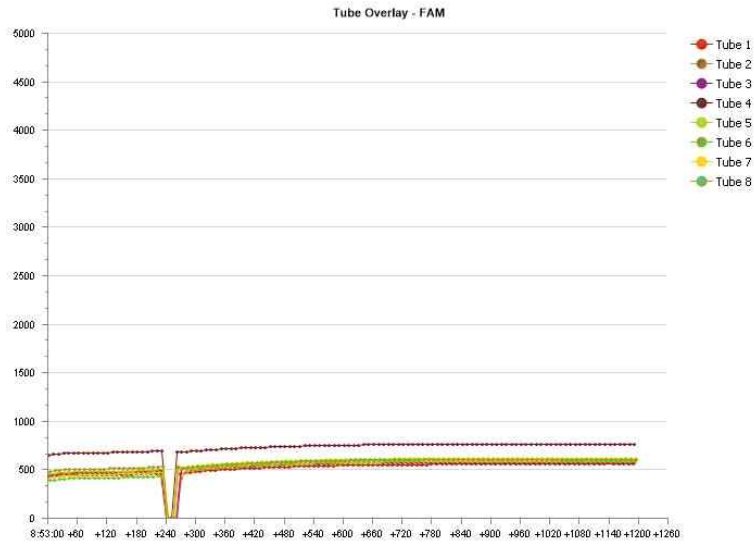


reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul	5.6 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul	5.6 ul
GFkV - 237 P	0.2 ul	1.6 ul
1pM		
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

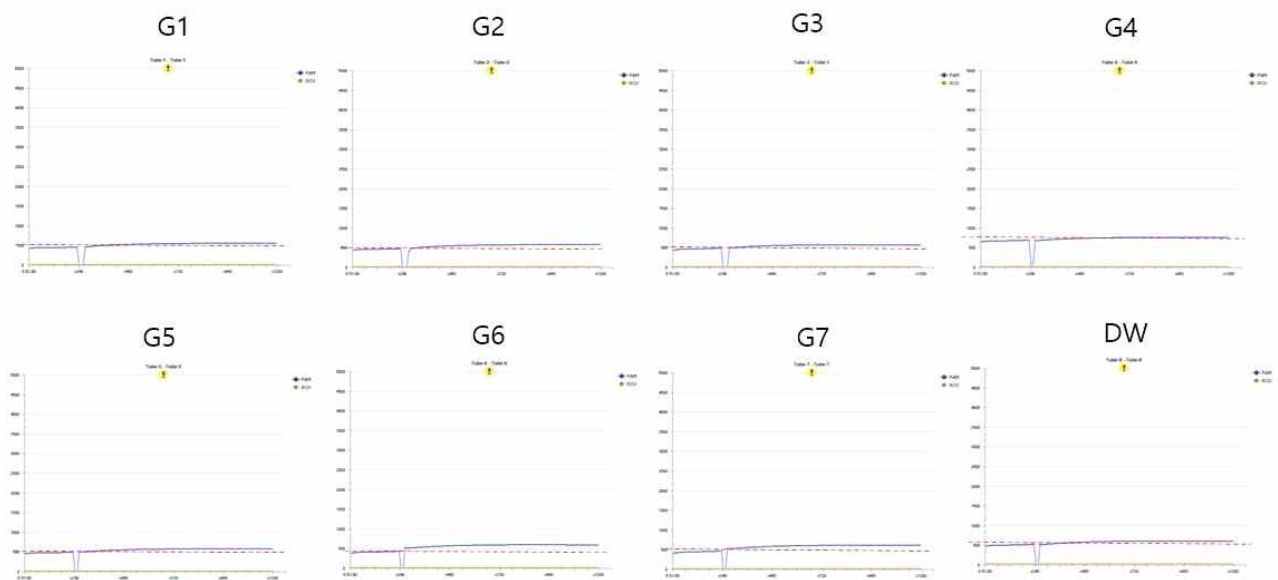


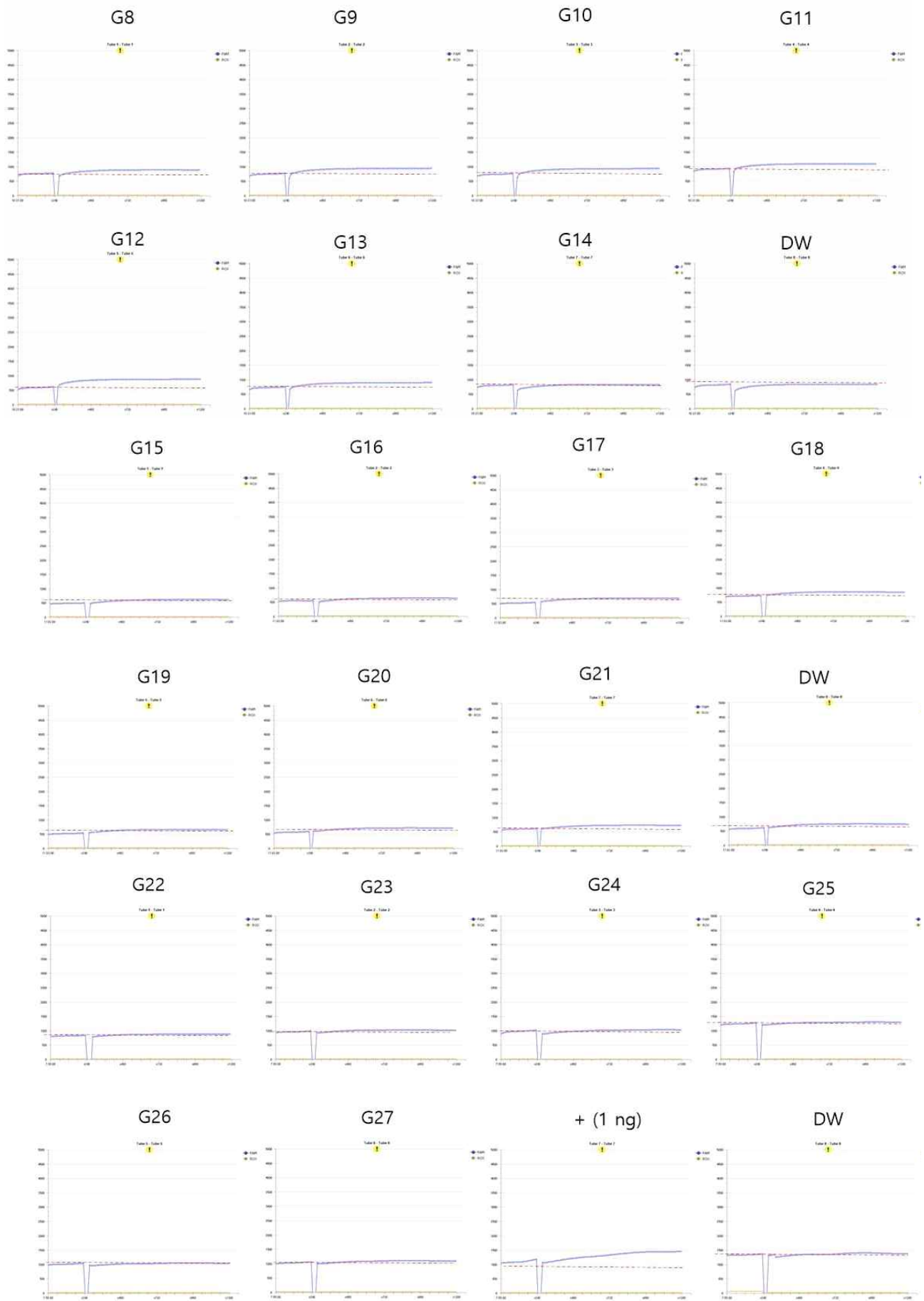
<그림 1-106> Limitation of Detection (copies/ul) of RPA Exo-RT reaction with primer and probe set of GFkV.

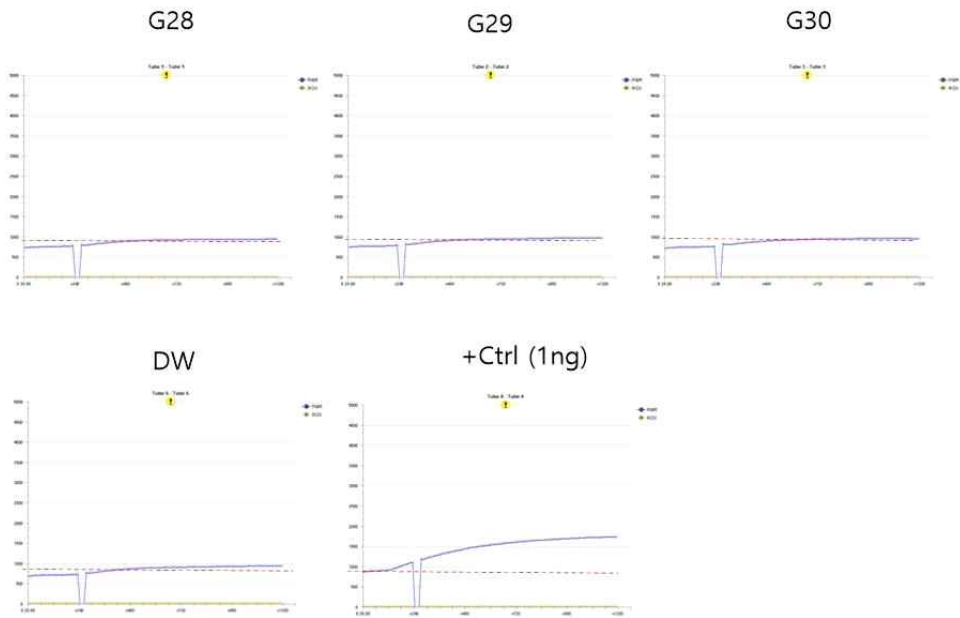
sample (G1-G7)



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul	5.6 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul	5.6 ul
GFkV - 237 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	







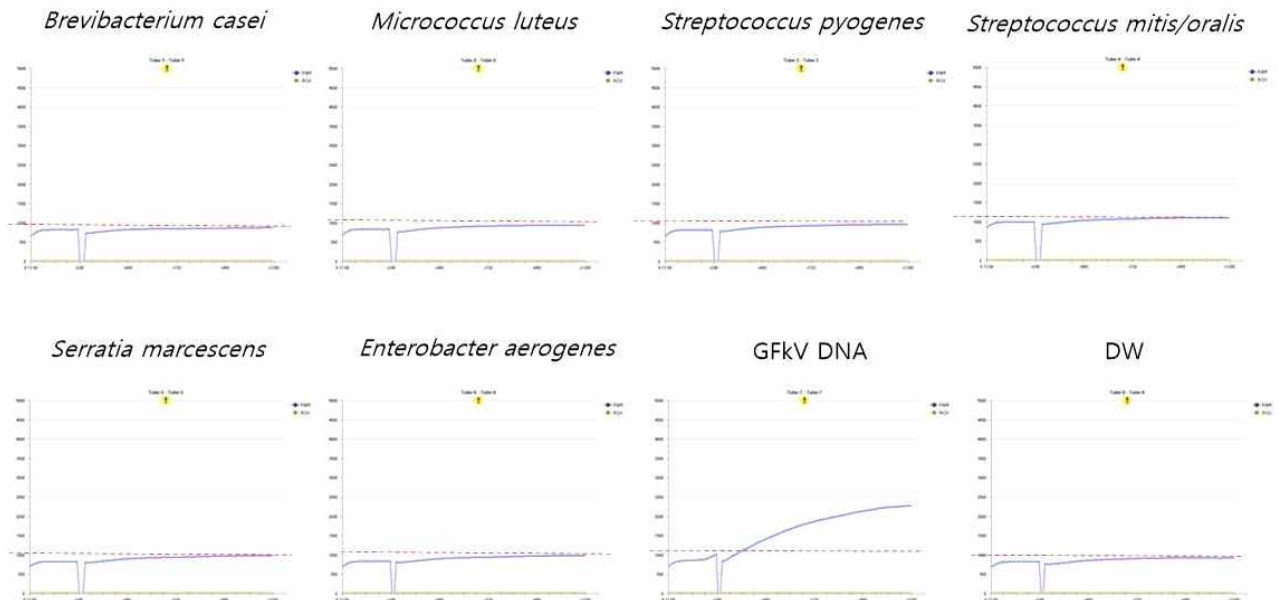
<그림 1-107> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of GfKv with field samples.

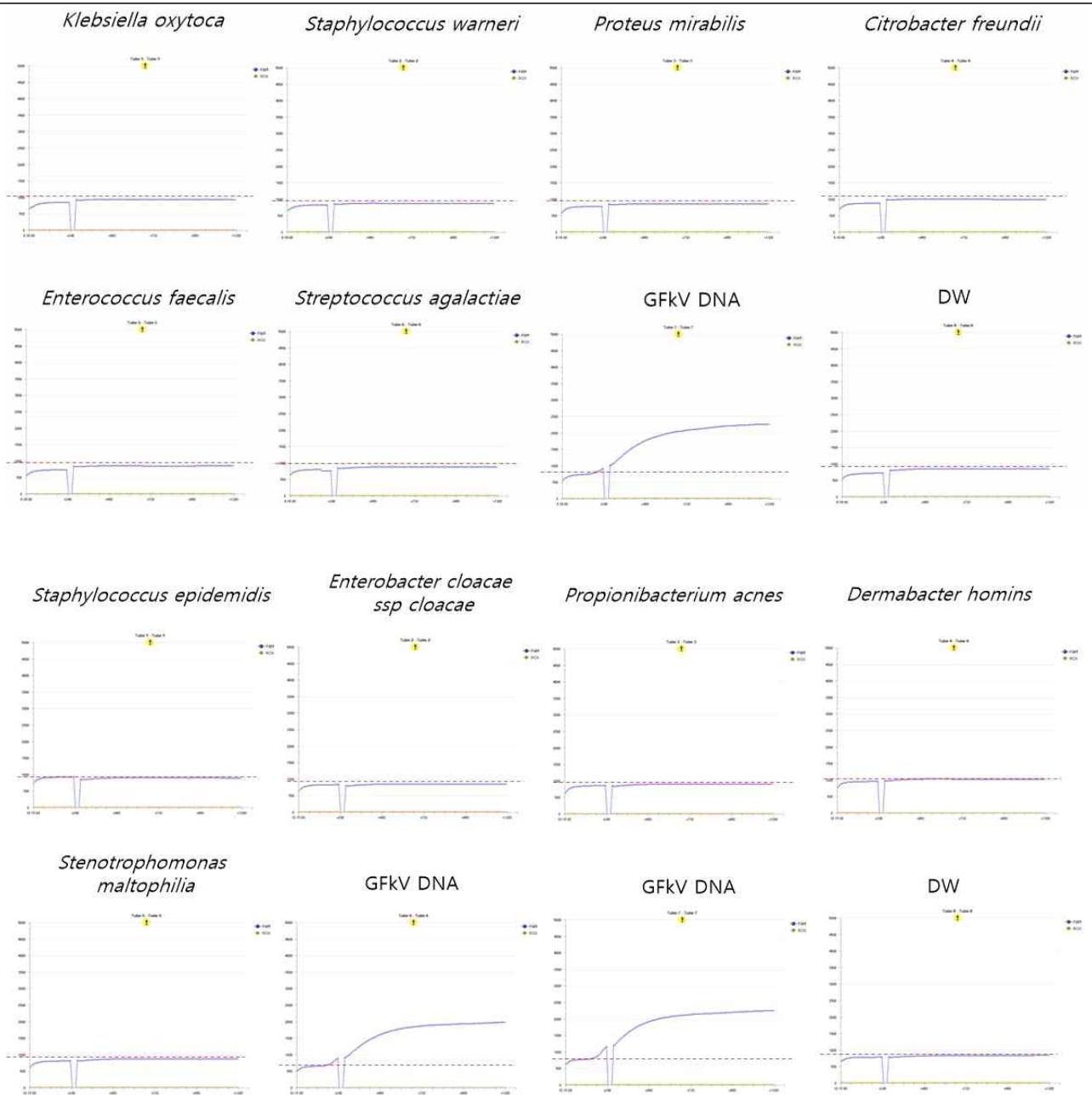
Table 3. RPA Exo-RT reaction of GfKv infected field samples

No.1	1	2	3	4	5	6	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	-	-	-		
End-RPA	-	+	+	-	-	+		
No.2	7	8	9	10	11	12	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	+	+	+	+	+	+		
No.3	13	14	15	16	17	18	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	+	-	-	-	-	+		
No.4	19	20	21	22	23	24	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	-	-	+	-	-	-		
No.5	25	26	27	28	29	30	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
End-RPA	-	-	-	-	-	-	+	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GfKV - 191 F	0.7 ul	5.6 ul
GfKV - 352 R	0.7 ul	5.6 ul
GfKV - 237 P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	GfKV - mRNA transcript	Positive





<그림 1-108> RPA Exo-RT reaction of primer and probe set of GfKV with several bacterial samples.

- GfKV isolates 45건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 네 개의 그룹으로 나누어지고 있었으나 분리주 간에 크게는 6%까지의 변이가 관찰되었다 (그림 1-101, 102).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 유전자 중간에 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; GfKV-191F, GfKV-237P, GfKV-352R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-103, 104).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-105).

- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 10 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-106).
- RT-RPA CTV detection kit의 민감도를 알아보기 위하여 30개의 샘플을 준비하여 RT-PCR를 수행한 결과, 27건이 양성이었고 3건이 음성이었다. 3건의 음성 샘플은 2건은 음성 한 건은 양성으로 RT-RPA GFkV detection kit에서 판정되었다. RT-RPA GFkV detection kit는 27건의 RT-PCR 양성 샘플에 대하여서는 11건이 양성이었다. 그러므로 RT-RPA GFkV detection kit의 민감도는 40.7% (11/27)였다 (그림 1-107, Table 3).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-107).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 GFkV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-108).
- RT-RPA GFkV detection kit는 특이도와 LoD가 좋았지만 민감도에서 좋은 결과를 얻지 못하여 시제품을 제작하지는 않았다.

■ GFkV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. GFkVnfo - 191 F :

5'- TAAGCXXXXXCCTCCCCTTCCAGTXXXGTGGTAT -3'

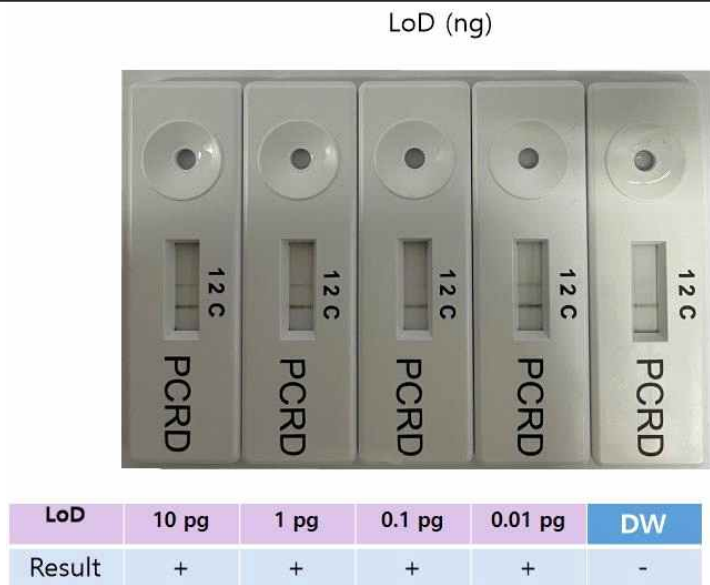
2. GFkVnfo - 237 P :

5'- [FAM]TTC CTG XXX XXX GAC ATC ACG GGC ACC GAG TCC [THF] CCT
ACA CCT XXX XXX CCA TC-3' Spacer C

3. GFkVnfo - 352 R :

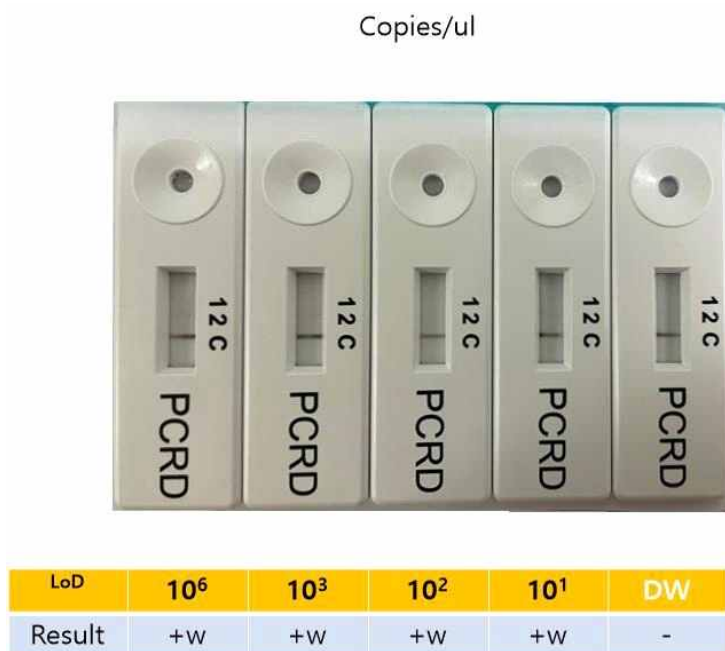
5'- [Biotin] CAGTGGGXXXGAAGGCTTCAAXXXGAGGTGAG-3'

<그림 1-109> RT-RPA nfo primer probe set of GFkV.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GFkVnfo-191F	0.7 ul	5.6 ul
GFkVnfo-352R	0.7 ul	5.6 ul
GFkVnfo-237P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

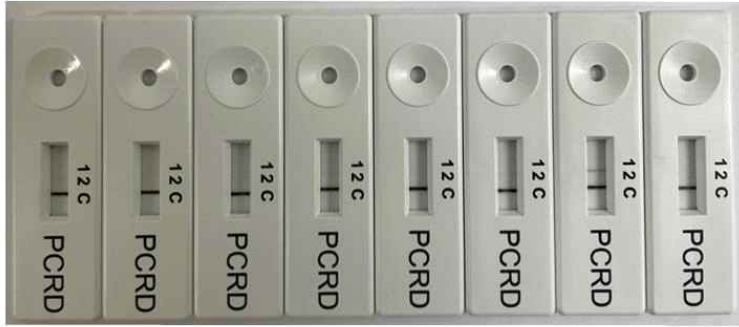
<그림 1-110> LoD (ng/ul) of RT-RPA nfo reaction with GFkV primer and probe set.



reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GFkVnfo-191F	0.7 ul	5.6 ul
GFkVnfo-352R	0.7 ul	5.6 ul
GFkVnfo-237P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-111> LoD (copies/ul) of RT-RPA nfo reaction with GFkV primer and probe set.

Filed samples



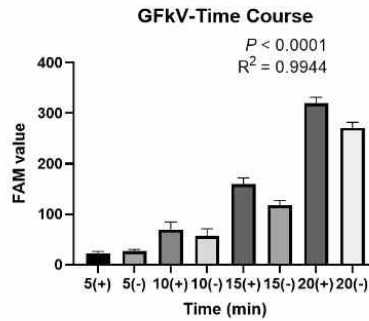
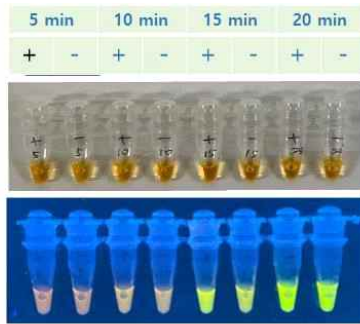
	G7	G8	G9	G10	G11	G20	+ ctrl	DW
PCR	+	+	+	+	+	-	+	-
PCRD	+w	+w	+w	+w	+w	+w	+	-

reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GfKvNfo-191F	0.7 ul	5.6 ul
GfKvNfo-352R	0.7 ul	5.6 ul
GfKvNfo-237P 1pM	0.2 ul	1.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

<그림 1-112> RT-RPA nfo reaction of GfKV primer and probe set with several field samples.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT GfKV primer & probe set를 응용하여 PCRD을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-109).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-110).
- 검출한계는 0.01 pg, 1 copies/ul까지 가능하였다 (그림 1-110, 111).
- RPA nfo kit를 사용하여 field에서 수집한 샘플을 이용하여 RNA를 분리한 후 GfKV nfo primer probe와 반응을 시켜서 RT-PCR결과와 비교해 본 결과 감염된 샘플과 잘 반응하였다 (그림 1-112).

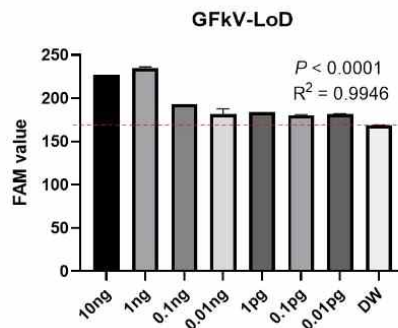
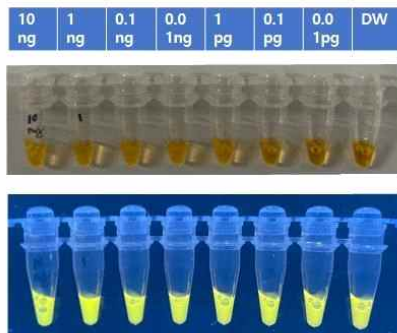
■ GFkV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.7 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.4 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	25	29	80	67	168	124	328	279
	19	24	58	47	150	111	311	263

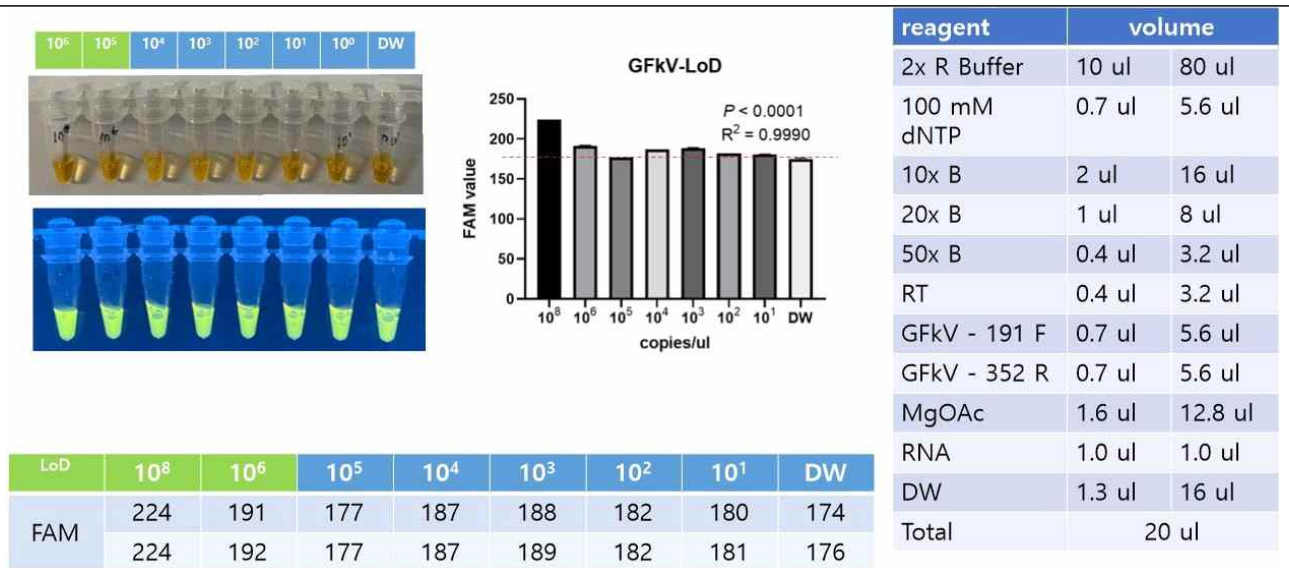
<그림 1-113> RT-RPA end point detection reaction of GFkV primer set according to the time.



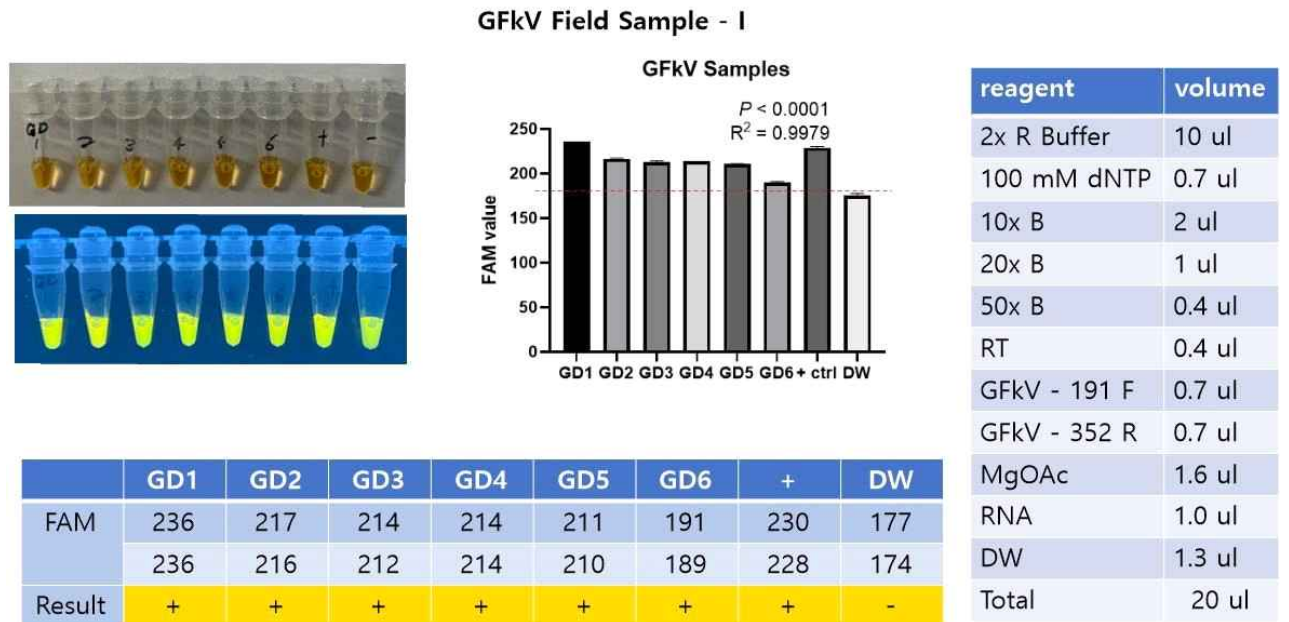
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul	5.6 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul	5.6 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.3 ul	16 ul
Total	20 ul	

LoD	10 ng	1 ng	0.1 ng	0.01 ng	1 pg	0.1 pg	0.01 pg	DW
FAM	227	236	193	186	184	181	182	168
	227	234	193	177	184	180	181	169

<그림 1-114> LoD (ng/ul) of GFkV RT-RPA end point detection kit.

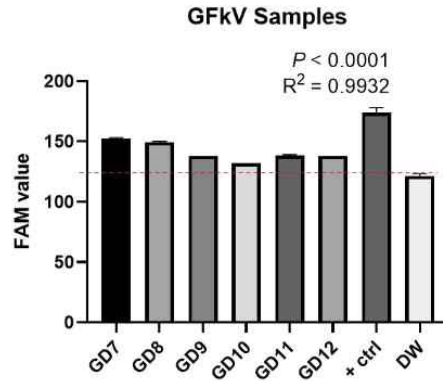
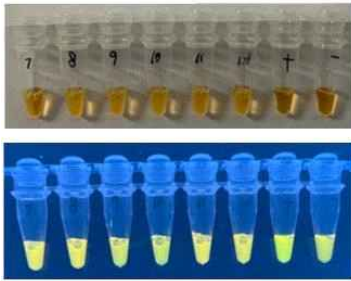


<그림 1-115> LoD (copies/ul) of GfKv RT-RPA end point detection kit.



<그림 1-116> RT-RPA end point detection reaction of GfKv primer set with field samples-I.

GfKv Field Sample - II

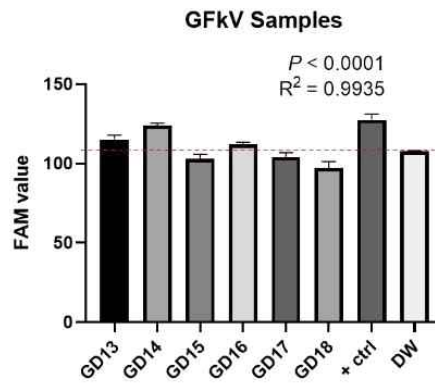
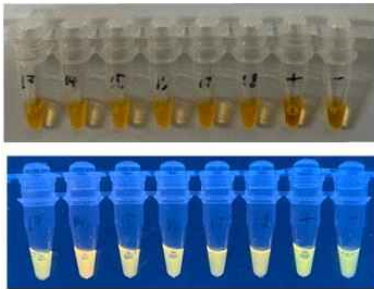


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
GfKv - 191 F	0.7 ul
GfKv - 352 R	0.7 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

	GD7	GD8	GD9	GD10	GD11	GD12	+	DW
FAM	152	150	138	132	139	138	177	123
	153	149	138	132	138	138	171	120
Result	+	+	+	+	+	+	+	-

<그림 1-117> RT-RPA end point detection reaction of GfKv primer set with field samples-II.

GfKv Field Sample - III

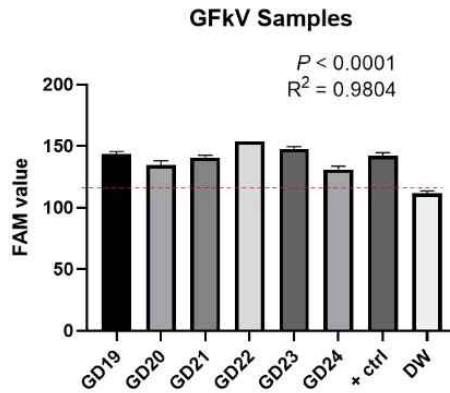
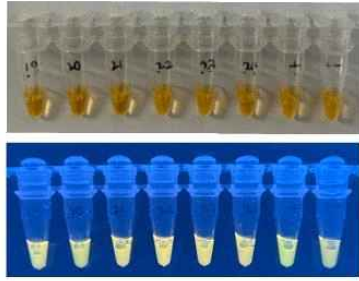


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
GfKv - 191 F	0.7 ul
GfKv - 352 R	0.7 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

	GD13	GD14	GD15	GD16	GD17	GD18	+	DW
FAM	117	125	105	113	106	100	130	108
	113	123	101	111	102	94	125	107
Result	+	+	-	+	-	-	+	-

<그림 1-118> RT-RPA end point detection reaction of GfKv primer set with field samples-III.

GFkV Field Sample - IV

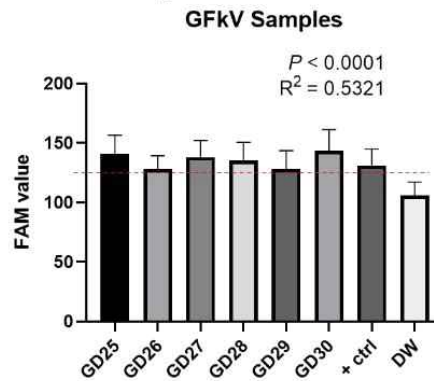
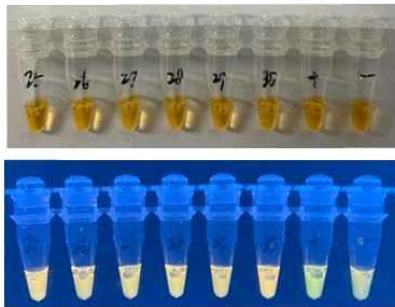


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

	GD19	GD20	GD21	GD22	GD23	GD24	+	DW
FAM	145	137	142	154	149	133	144	113
	142	132	139	154	146	129	140	110
Result	+	+	+	+	+	+	+	-

<그림 1-119> RT-RPA end point detection reaction of GFkV primer set with field samples-IV.

GFkV Field Sample - V



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
GFkV - 191 F	0.7 ul
GFkV - 352 R	0.7 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

	GD25	GD26	GD27	GD28	GD29	GD30	+	DW
FAM	152	136	148	146	139	156	141	114
	130	120	128	124	117	131	121	98
Result	+	+	+	+	+	+	+	-

<그림 1-120> RT-RPA end point detection reaction of GFkV primer set with field samples-V.

Table 4. RPA end point detection reaction of GFkV infected field samples

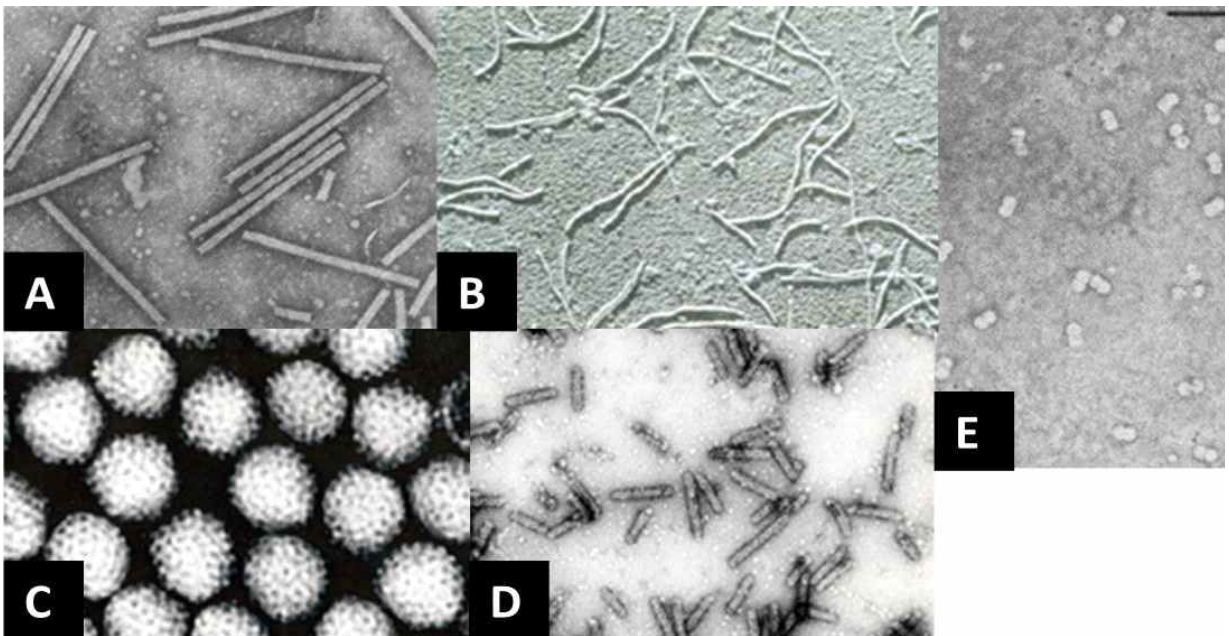
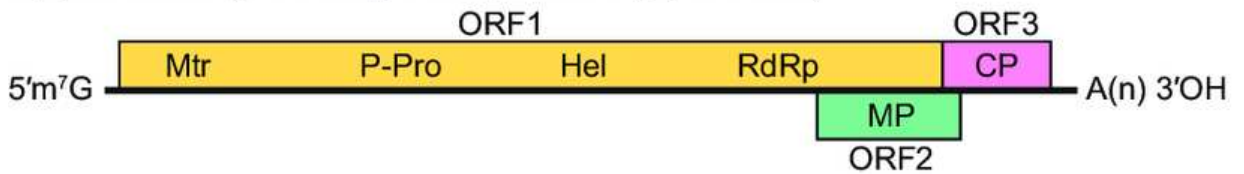
No.1	1	2	3	4	5	6	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	-	-	-		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
No.2	7	8	9	10	11	12	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
No.3	13	14	15	16	17	18	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	-	+	-	-	+	-
No.4	19	20	21	22	23	24	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-
No.5	25	26	27	28	29	30	+ Ctrl	DW
RT-PCR	+	+	+	+	+	+		
Exo-RPA	+	+	+	+	+	+	+	-

- 사이버그린을 이용한 GFkV end point detection kit는 반응 후 10분부터 음성과 양성을 구별할 수 있었다 (그림 1-113).
- 최소검출한계 (ng/ul)를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10 ng 부터 0.01 pg 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 15분간 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 검출이 되었다 (그림 1-114).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 15분간 반응시킨 결과, 10^5 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-115).
- RT-RPA GFkV end point detection kit의 민감도를 알아보기 위하여 30개의 샘플을 준비하여 RT-PCR를 수행한 결과, 27건이 양성되었고 3건이 음성이었다. 3건의 음성 샘플은 RT-RPA GFkV end point detection kit에서 양성으로 판정되었다. RT-RPA GFkV end point detection kit는 27건의 RT-PCR 양성 샘플에 대하여서는 24건이 양성이었다. 그러므로 RT-RPA GFkV detection kit의 민감도는 88.9% (24/27)였다 (그림 1-116, 117, 118, 119, 120, Table 4).
- RT-RPA GFkV end point detection kit는 특이도와 민감도가 현장에서 스크린용으로 사용하기에 적당할 것으로 사료된다.

■ 주관연구기관- (주) 엘씨엠사이언스 연구결과

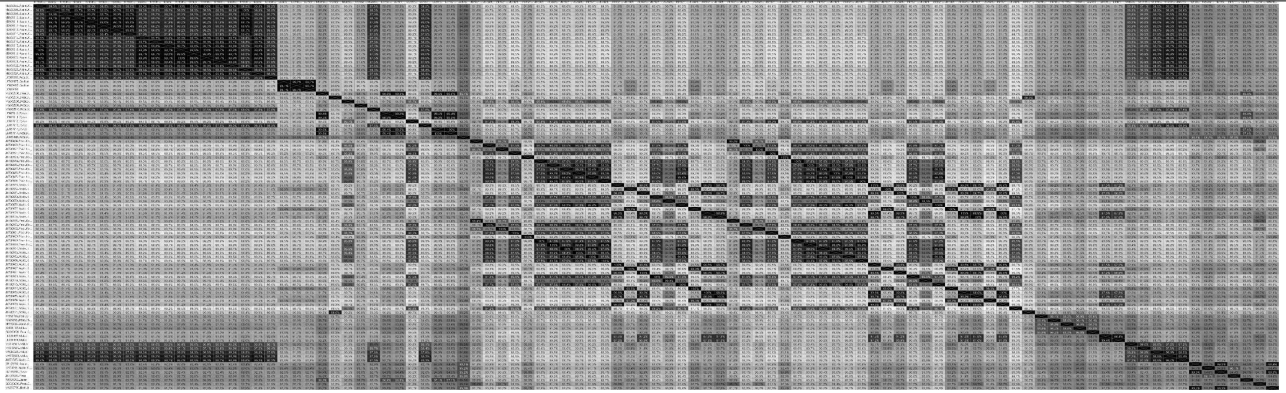
1. Apple stem grooving virus (ASGV) - RPA probe 진단제 개발

Apple stem grooving virus, ASGV (6,495 nts)

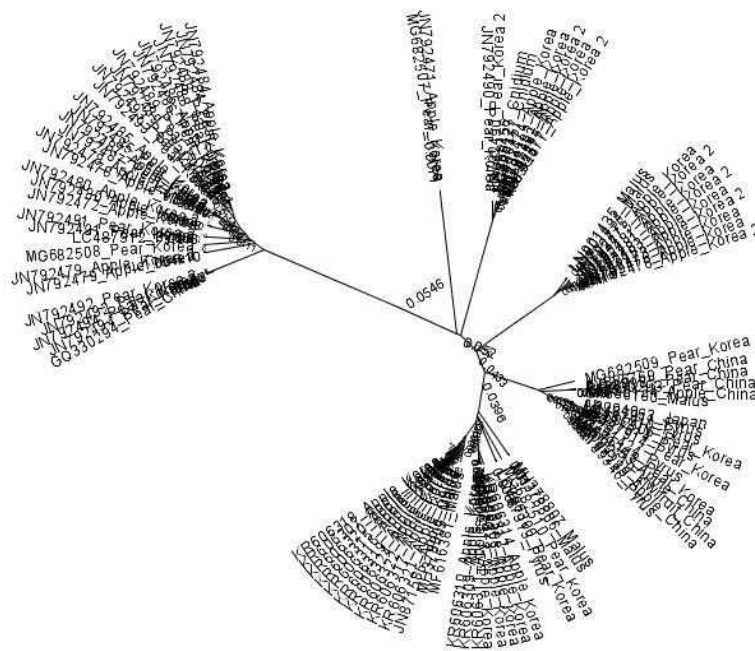


<그림 1-1> Genetic map, Symptom, EM of ASGV.

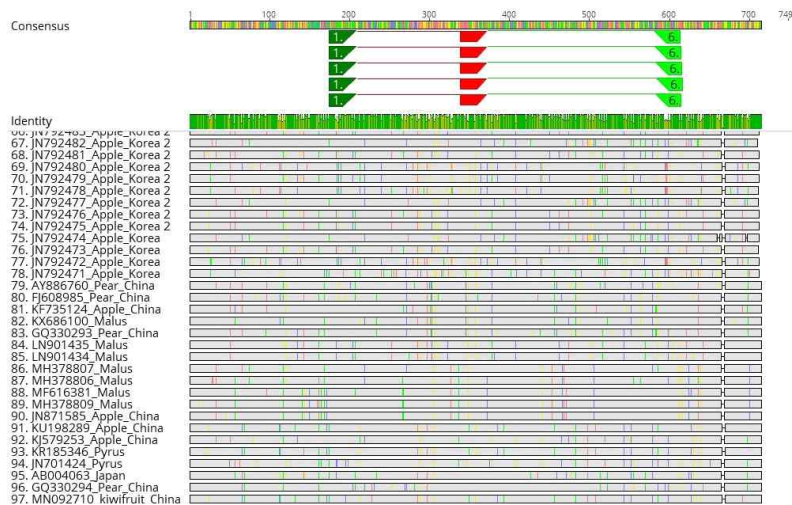
1) ASGV-CP (97건)에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인



<그림 1-2> Comparison the homology of 97 cases of ASGV-CP genes.



<그림 1-3> Phylogenic tree of 97 cases of ASGV-CP genes.



<그림 1-4> Region of primer and probe of ASGV-CP genes.

ASGV 175 F: TGAAATATTTATTTGGTAATATTGCTGTTTTTCGG
 ASGV 615R: TTTTCATCAGGTGTTAAACGATTCATTTTTAGAC

<그림 1-5> Candidate of primer set No.1 of ASGV-CP genes.

RPA Basic Liquid – End point detection test

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Apple 3-2	Apple 3-4	Apple 3-5	Apple 3-6	Pear U1-2	Pear U4-4	Pear U4-5	Pear NJ-3
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+
End point	-	+	-	-	+	+	-	+
FAM	66	118	90	61	121	163	86	111
FAM	69	124	94	65	126	171	93	129
FAM	57	93	63	48	92	114	66	81

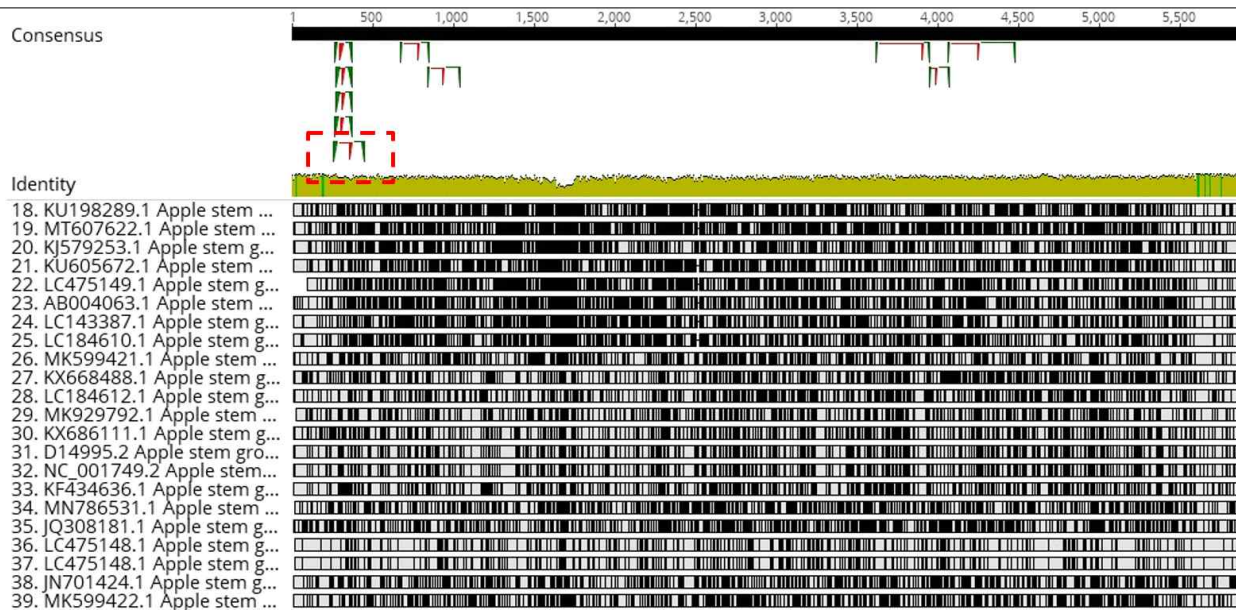
Reaction	Volume
2x R.Buffer	12.5 ul
10 x	2.5 ul
20 x	1.25 ul
RT	0.5 ul
ASGV 175F	1.0 ul
ASGV 615R	1.0 ul
RNA	2.0 ul
DW	2.75 ul
MgOAC	1.5 ul
	25 ul

	9	10	11	12	13	14	DW	DW
	Pear S4-4	Pear S1-3	Pear NU-6	Pear NU-3	Apple 1-6	Apple 1-11		
PCR	+	+	+w	+w	-	-		
End point	-	-	+	+	-	-		
FAM	79	68	128	120	90	94	67	65
FAM	80	69	131	123	91	95	67	66
FAM	49	46	83	77	60	59	44	42

<그림 1-6> Result of End point detection kit with ASGV-CP primer set No.1.

- ASGV-CP 유전자 97건에 대한 유전자를 분석한 결과 5개의 sub type으로 나뉘었다.
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과 한 개의 프라이머 세트가 지정되었고 프로브는 생성되지 않아서 프라이머 세트만 (Primer set No.1; ASGV 175F, ASGV 615R) 평가하였다 (그림 1-4, 5).
- RPA Liquid Basic kit를 사용하여 12개의 ASGV 양성시료와 2개의 음성시료를 Primer set No.1과의 반응성 여부를 확인하였다.
- RPA 반응은 37°C에서 15분간 반응시킨후 사이버그린 I을 첨가하여 HARU-2000 등온핵산증폭기로 FAM 값을 측정하였다.
- 양성판정기준은 음성대조군 (증류수)의 FAM값의 두배로 정하였다.
- 그 결과 12개의 양성 샘플 중에서 6개만이 RPA 반응에서 양성으로 판정되었다 (그림 1-6).
- 민감도가 50% 밖에 안되어서 새로운 프라이머를 디자인하기로 하였다.

2) ASGV full sequence (39건) 에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인 I



<그림 1-9> Region of primer and probe set No.2 of ASGV full sequences.

ASGV Full - Primer and Probe

1. ASGV 258 F:
5'-CCAATATCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTTGTA-3'
2. ASGV 351P:
5'- TTT TCA CTT AGA GAA AAT AAA GTT AAT AGT[FAM-dT] T [THF] C [BHQ1-dT] CAA
GAT GCA TTC AGT-[3'-block]
3. ASGV- 465 R:
5'- CACCATACCTATATTTATCTTCCCATCAATTATG -3'

<그림 1-10> Candidate of primer and probe set No.2 of ASGV full genes.

EXO RT-RPA test									Reaction	Volume
1	2	3	4	5	6	7	8		2x R.Buffer	12.5 ul
Apple 3-2	Apple 3-4	Apple 3-5	Apple 3-6	Pear U1-2	Pear U4-4	Pear U4-5	Pear NJ-3		10 mM d NTP	2.0 ul
+	+	+	+	+	+	+	+	PCR	10 x	2.5 ul
-	-	-	-	-	-	-	-	RT_EXO	20 x	1.25 ul
									50 x	0.5 ul
									RT (new)	1.0 ul
9	10	11	12	13	14	DW	DW		ASGV 258F	1.5 ul
Pear S4-4	Pear S1-3	Pear NU-6	Pear NU-3	Apple 1-6	Apple 1-11				ASGV 465R	1.5 ul
+	+	+w	+w	-	-	-	-	PCR	ASGV 351P	0.1 ul
-	-	-	-	-	-	-	-	RT_EXO	RNA	2.0 ul
									DW	0.0 ul
									MgOAC	1.5 ul
									total	26.35 ul

<그림 1-11> Result of Real time Exo RT-RPA kit with ASGV full primer probe set No.2.

RPA - Basic liquid kit – End point detection

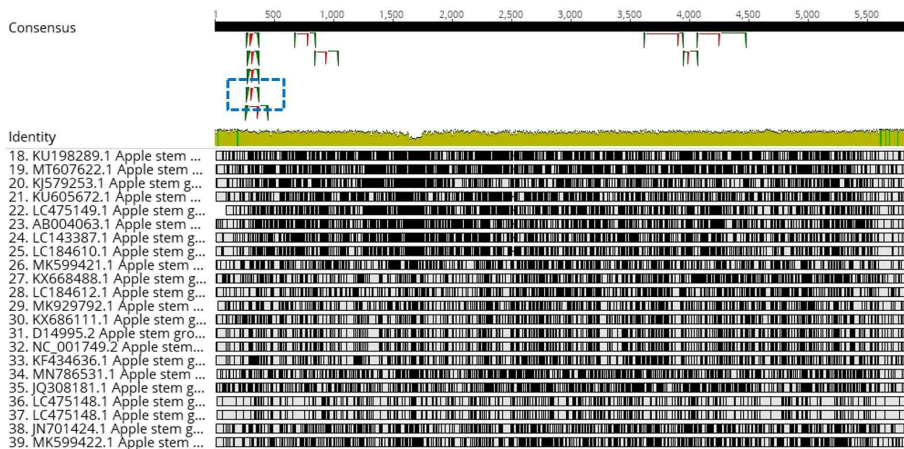
1	2	3	4	5	6	7	DW	
Apple 3-2	Apple 3-4	Apple 3-5	Apple 3-6	Pear U1-2	Pear U4-4	Pear U4-5		
+	+	+	+	+	+	+	-	PCR
29	47	36	30	45	51	41	33	FAM
12	28	19	15	29	30	24	17	FAM
12	27	19	17	28	30	27	21	FAM

Reaction	Volume
2x R.Buffer	12.5 ul
10 x	2.5 ul
20 x	1.25 ul
RT (new)	1.0 ul
ASGV 258F	1.0 ul
ASGV 465R	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	3.25 ul
MgOAC	1.5 ul
total	25 ul

<그림 1-12> Result of End Point RPA reaction with ASGV full primer probe set No.2.

- ASGV full sequence 39건에 대한 유전자를 분석한 결과, grouping이 전혀되지 않을 정도로 유전자가 많이 달랐다 (그림 1-7, 8).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중 한 개 (빨간색 점선 박스) 프라이머와 프로브 세트 (Primer probe set No. 2; ASGV 258F, ASGV 351P, ASGV 465R)를 평가하였다 (그림 1-9, 10).
- RPA Exo kit를 사용하여 12개의 ASGV 양성시료와 2개의 음성시료를 Primer probe set No.2와의 반응성 여부를 확인하였다.
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰으나 전혀 반응이 없어 프로브에 문제가 있는 것으로 판단하여 프라이머 세트만으로 다음 실험을 수행하였다 (그림 1-11).
- RPA Liquid Basic kit를 사용하여 7개의 ASGV 양성시료와 Primer probe set No.2와의 반응성 여부를 확인하였다.
- RPA 반응은 37°C에서 15분간 반응시킨후 사이버그린 I을 첨가하여 HARU-2000 등온핵산증폭기로 FAM 값을 측정하였다.
- 양성판정기준은 음성대조군 (증류수)의 FAM값의 두배로 정하였다.
- 그 결과 7개의 양성 샘플이 모두 음성으로 나왔다 (그림 1-12).

3) ASGV full sequence (39건) 에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인 II



<그림 1-13> Region of primer and probe set No.3 of ASGV full sequences.

1. ASGV2-264F:

5'-TCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTTGTACATATG-3'

2. ASGV2-299P:

5'- GTA TTC CAA GTT ATT CCA AGT CTT CTA TCT [FAM-dT] CC [THF] T
 [BHQ1-dT] AAG TCA GTT GCC TTT -[3'-block]

3. ASGV2-387R:

5'- CTGAATGCATCTTGAGAAACTATTAAC TTTATTT-3'

<그림 1-14> Candidate of primer and probe set No.3 of ASGV full genes.

Exo RT-RPA test

ASGV2

8	9	10	11	12	13	14	DW	
Pear NJ-3	Pear S4-4	Pear S1-3	Pear NU-6	Pear NU-3	Apple 1-6	Apple 1-11		
+	+	+	+w	+w	-	-	-	PCR
-	-	-	-	-	-	-	-	Exo-probe

Reaction	Volume
2x R.Buffer	12.5 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10 x	2.5 ul
20 x	1.25 ul
50 x	0.5 ul
RT	0.5 ul
ASGV2 264F	0.8 ul
ASGV2 387R	0.8 ul
ASGV2 299P	0.1 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.85 ul
MgOAC	1.5 ul
total	25 ul

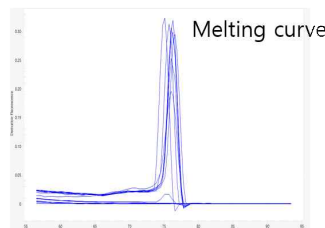
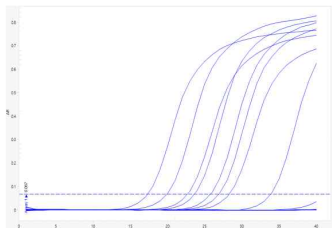
<그림 1-15> Result of Real time Exo RT-RPA kit with ASGV full primer probe set No.3.

ASGV2 – good primer but bad probe

1	2	3	4	5	6	7	8	
Apple 3-2	Apple 3-4	Apple 3-5	Apple 3-6	Pear U1-2	Pear U4-4	Pear U4-5	DW	
28.23	22.63	25.74	23.58	19.89	17.27	26.88	0	Ct
76.3	76.3	76.3	76.3	76.6	75.7	75.1	0	Tm

11 (0.2 ul)	12 (0.2 ul)	13	14	DW	
Pear NU-6	Pear NU-3	Apple 1-6	Apple 1-11		
33.8	0	0	0	0	Ct
76	75.4	0	0	0	Tm

Reaction	Volume
2x TB	5 ul
Taq	0.6 ul
ASGV2 264F	0.4 ul
ASGV2 387R	0.4 ul
Rox dye	0.2 ul
RT	0.2 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.2 ul
	10 ul



42C	5 min
95C	10 sec
95C	5 sec
60C	34 sec
95C	15 sec
55C	15 sec
95C	15 sec

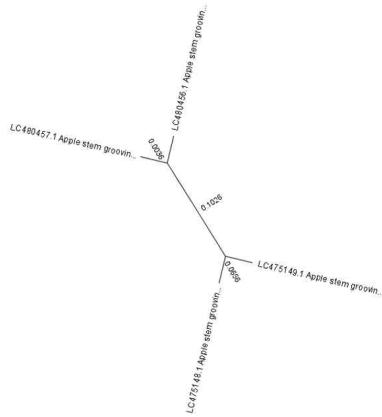
<그림 1-16> Result of Real time RT-PCR with ASGV full primer probe set No.3.

- 프라이머와 프로브 세트 (Primer probe set No. 2; ASGV 258F, ASGV 351P, ASGV 465R) 평가한 결과가 좋지 않았다 (그림 1-11, 12).
- 그래서 같은 위치에서 다른 프라이머 프로브 세트를 선정하였다 (Primer probe set No. 3; ASGV2 264F, ASGV2 299P, ASGV2 387R) (그림 1-13, 14).
- RPA Exo kit를 사용하여 5개의 ASGV 양성시료와 2개의 음성시료를 Primer probe set No.3 와의 반응성 여부를 확인하였다.
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰으나 전혀 반응이 없어 프로브에 문제가 있는 것으로 판단하여 프라이머 세트만으로 다음 실험을 수행하였다 (그림 1-15).
- 프라이머만을 이용하여 real time RT-PCR반응을 7개의 ASGV 양성시료로 수행하였다.

○ 그 결과 7개의 양성 샘플이 모두 양성으로 나왔고 한개의 melting curve가 작성되어 프라이머는 잘 디자인된 것으로 사료되었다 (그림 1-16).

4) ASGV full sequence (Korean isolates 4건)에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인

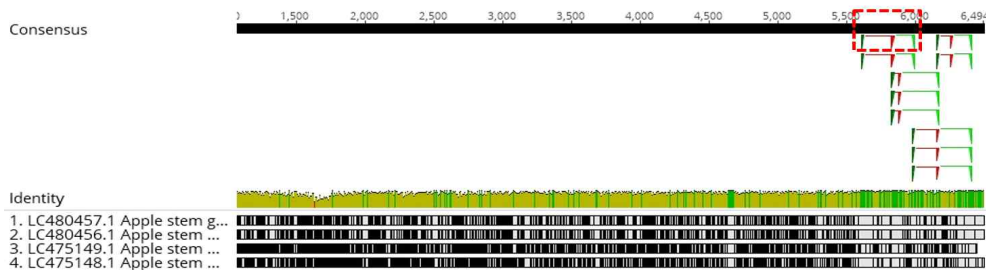
ASGV3 – Phylogenetic tree



ASGV3 – Homology distance

	LC48045...	LC48045...	LC47514...	LC47514...
LC480457,1 Apple ...		99,3%	81,3%	83,8%
LC480456,1 Apple ...	99,3%		81,4%	83,9%
LC475149,1 Apple ...	81,3%	81,4%		88,2%
LC475148,1 Apple ...	83,8%	83,9%	88,2%	

<그림 1-17> Phylogenetic tree and homology distance of 4 cases of ASGV full Korean isolates sequences.



<그림 1-18> Region of primer and probe set No.4 of ASGV full Korean isolate sequences.

1. ASGV3-5610F :

5'- TCTCAGCTAGAATTGAAAGATTTGGAAAAA -3'

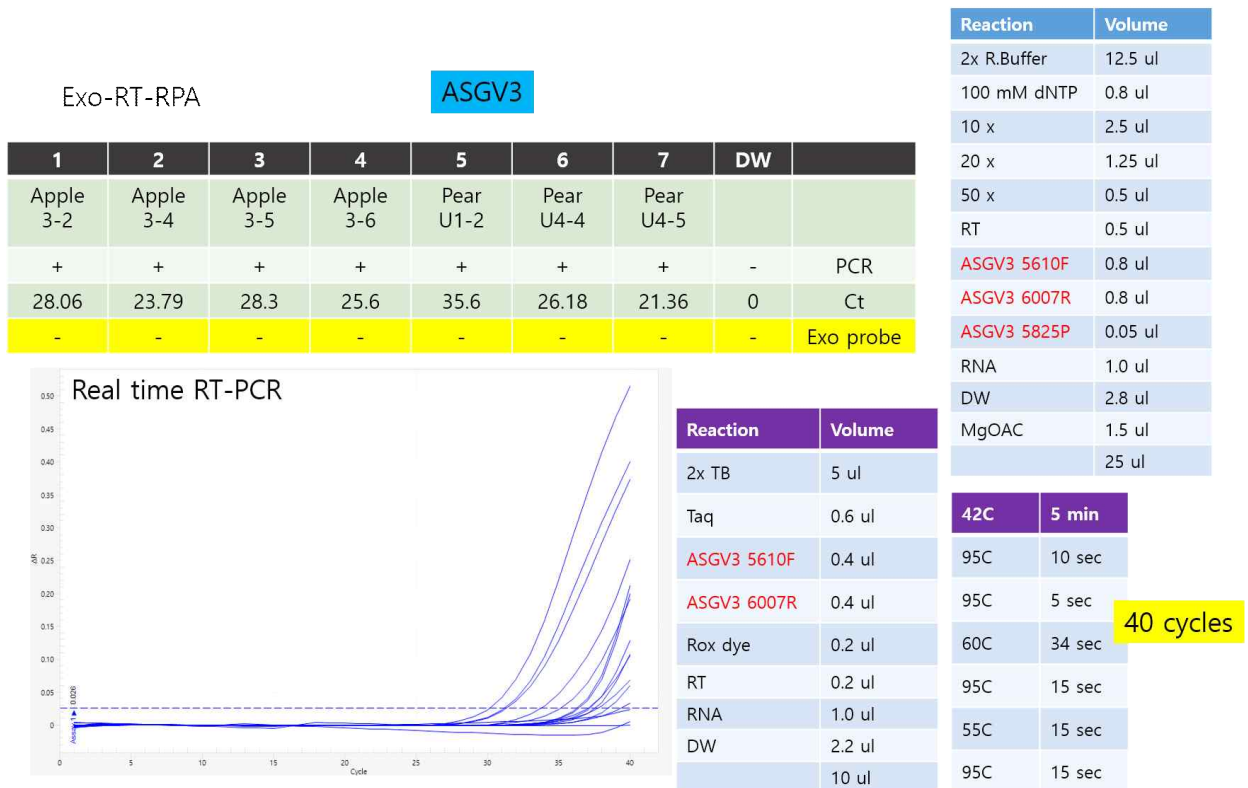
2. ASGV3- 5825P :

5'- TTA CTG TAA ATA CTT ATT TGG TAA TAT TGC [FAM-dT] G [THF] T [BHQ1-dT] TCG
GGT CAT CTG ATA-[3'-block]

3. ASGV3-6007R:

5'- GACAAGTCGATTCTCCAAATTTTTGTTTTT -3'

<그림 1-19> Candidate of primer and probe set No.4 of ASGV full Korean isolate genes.



<그림 1-20> Result of Real time RT-PCR and Exo-RT-RPA with ASGV full Korean isolate primer probe set No.4.

- ASGV full Korean isolate sequence 4건에 대한 유전자를 분석한 결과도 앞선 결과와 마찬가지로 유사성이 전혀 보이지 않았다 (그림 1-17).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중 한 개 (빨간색 점선 박스) 프라이머와 프로브 세트 (Primer probe set No. 4; ASGV3 5610F, ASGV3 5825P, ASGV3 6007R)를 평가하였다 (그림 1-18, 19).
- RPA Exo kit를 사용하여 7개의 ASGV 양성시료와 Primer probe set No.4와의 반응성 여부를 확인하였다.
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰으나 전혀 반응이 없어

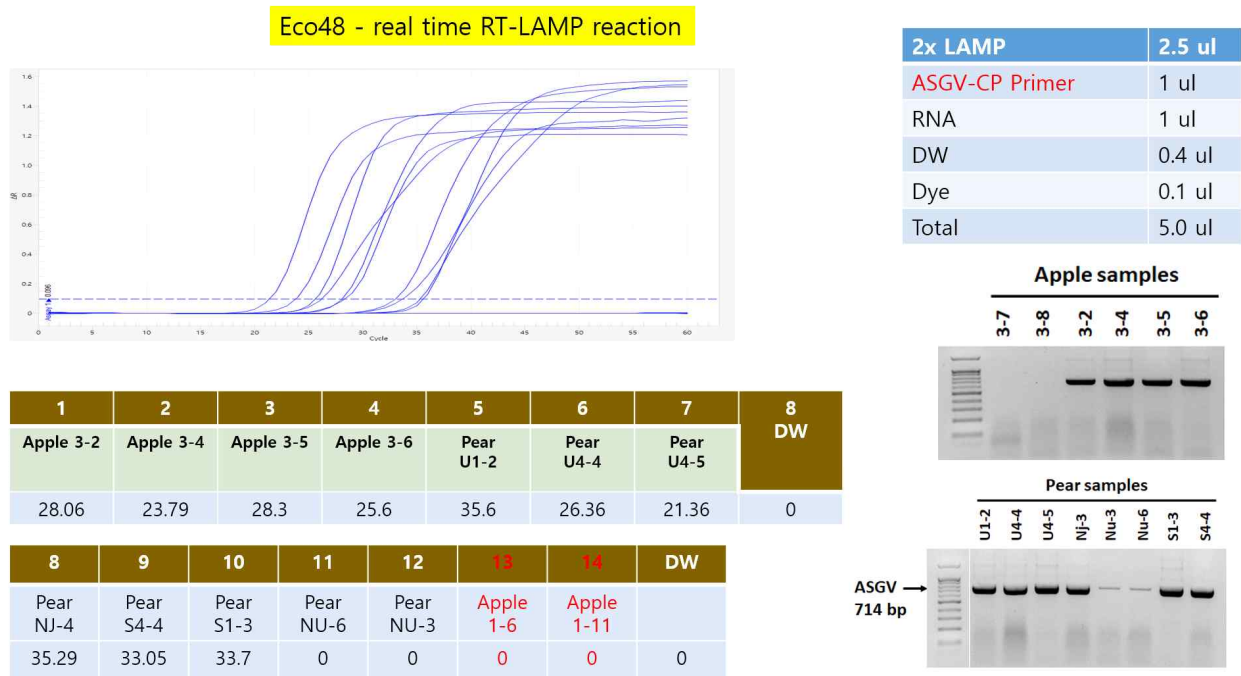
프로브에 문제가 있는 것으로 판단하여 프라이머 세트만으로 다음 실험을 수행하였다 (그림 1-20).

- 프라이머만을 이용하여 real time RT-PCR반응을 7개의 ASGV 양성시료로 수행하였다.
- 그 결과 7개의 양성 샘플이 모두 양성으로 관찰되어 프라이머는 잘 디자인된 것으로 사료되었다 (그림 1-20).
- 여러번의 프라이머와 프로브 디자인에도 RPA probe법을 이용한 ASGV 진단에 사용할 만한 것이 없어서 램프법으로 접근을 시도하였다.

5) ASGV-CP sequence 대한 LAMP 프라이머 디자인

TTGGCCACCAACATTTACAAGAAATGGCCCAAAGCTTTTGAAAAAAGTCCATGGGTGGCATTGACTTT
 GCCACTGGTCTAAAAATGAATCGTTTAACACCTGATGAAAAACAGGTGATTGATAGAATGACCAAAG
 GCTTTTTTCGACTGAAGGACAAAAATGGGGTTTTTCGAGGCAGGTTCCGGAGAGTAACCTGGAAGTGGAG
 GGTTAGAAC

<그림 1-21> Target region of ASGV-CP LAMP primer.



<그림 1-22> Real time RT-LAMP reaction of ASGV-CP LAMP primer.

- ASGV에 대한 RPA probe에 디자인이 쉽지 않았다. 이는 우수한 품종을 얻기 위한 육종의 과정으로 바이러스 역시 함께 번이가 일어난 것으로 보인다. 해서 본 연구에서는 다른 진단법인 LAMP법으로 프로브세트를 디자인하여 ASGV감염 시료에 대한 진단을 시도하였다. 유전자 부위는 coat protein이었다.
- Real time RT-LAMP reaction으로 12건의 ASGV 감염목 중에서 10건을 검출할 수 있었고, 양성인 나머지 두건은 PCR에서 아주 약하게 반응한 시료였다. 두건의 음성 시료는 반응하지 않았다 (그림 1-22). 이 프라이머 세트를 이용하여 ASGV real time LAMP detection kit를 제작하

였다 (그림 1-24, 25).

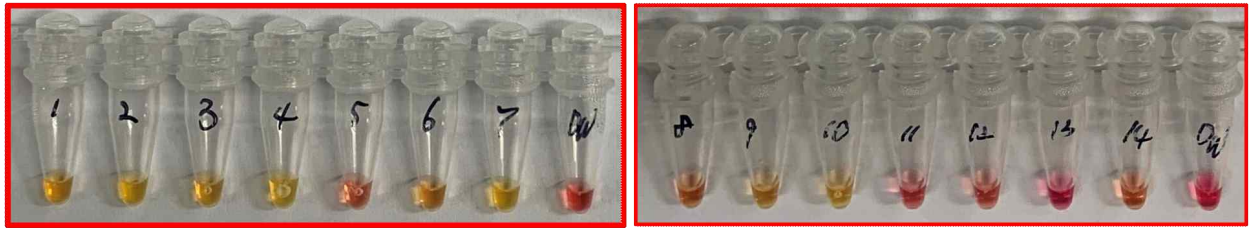
ASGV-CP Eye detection LAMP kit

1	2	3	4	5	6	7	DW	Time
Apple 3-2	Apple 3-4	Apple 3-5	Apple 3-6	Pear U1-2	Pear U4-4	Pear U4-5		
28.06	23.79	28.3	25.6	35.6	26.18	21.36	0	Ct
+	+	+	+	+w	+	+	-	40 min

8	9	10	11	12	13	14	DW	Time
Pear NJ-3	Pear S4-4	Pear S1-3	Pear NU-6	Pear NU-3	Apple 1-6	Apple 1-11		
35.29	33.05	33.90	0	0	0	0	0	Ct
+	+	+	-	-	-	-	-	40 min

2x C LAMP	10 ul
ASGV-CP Primer	4 ul
RNA	1 ul
DW	5 ul
Total	20 ul

Pink - negative
Yellow - positive



<그림 1-23> ASGV-CP Eye detection LAMP kit using HARU-2000 nucleic acid amplifier.

- ASGV-CP LAMP primer를 이용하여 육안으로 결과를 관찰할 수 있는 ASGV-CP Eye detection LAMP kit를 제조하여 12건의 양성과 2건의 음성 시료를 검사하였다.
- 양성시료는 노란색으로 변하고, 음성시료는 붉은 빛을 띄게 된다.
- Eye detection LAMP 반응에서 10건이 노란색으로 변하여 양성이었다고, 색깔의 반응 정도를 real time LAMP reaction에서 얻은 Ct값과 비교해 보니, 정비례하였다 (그림 1-23).
- 음성의 두건은 붉은 빛을 유지하였고, 음성 대조군으로 사용한 증류수 또한 붉은 빛을 띄었다.
- 이 결과를 바탕으로 ASGV eye detection kit를 제작하였다 (그림 1-26, 27).



<그림 1-24> Development of ASGV real time LAMP detection kit.

Sp-ASGV-RT-LAMP-50 ASGV Real Time LAMP Detection Kit 50 rxn

Revision No.: Sp_ASGV_RT_LAMP-001
Issue Date: Oct. 16, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by Speegenebio Co.
speegene@gmail.com Tel: +82-10-8621-2676
553 Sansongdae-ro Sujeong-gu Seongnam-si Gyeonggi-do
#608 Euljikwan Eulji University 13135 Republic of Korea

1. 제품 설명

ASGV real time LAMP detection kit 는 LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 기법을 이용하여 등온 조건에서 국내에서 유행하는 Apple stem grooving Virus 유전자를 증폭할 수 있도록 구성된 제품입니다. LAMP는 strand displacement DNA synthesis 기능을 가지는 Bst polymerase를 이용하여 6개의 프라이머에 의해 반응이 이루어집니다. 먼저 내부 프라이머가 DNA 에 결합하여 신장되면서 strand displacement가 발생하며 먼저 형성된 가닥은 떨어져 나오게 됩니다. 떨어져 나온 단말가닥의 5'-말단에서부터 loop 구조가 형성되며 이는 3'-말단에서도 같은 과정이 반복되고 loop구조가 신장되게 됩니다. LAMP 를 수행하기 위해서는 증폭 시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 프라이머를 사용하게 됩니다 이는 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때, LAMP는 타겟 DNA에 대한 특이성이 매우 높아짐을 의미합니다. 본 제품은 ASGV의 coat protein 유전자를 검출할 수 있도록 디자인한 제품입니다.

2. 제품 특성

- 1) 고특이성 검사: 일반 PCR법이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때 LAMP 의 경우 6개의 유전자 위치를 인식하도록 프라이머를 설계하기 때문에 타겟 DNA에 높은 특이성을 가지고 있습니다.
2) 경제성 검사: 등온 증폭의 특성상 온도 변화에 따른 DNA의 손실 손상이 없기 때문에 증폭효율이 매우 높으며 온도조절이 필요없기 때문에 상대적으로 반응시간이 짧아집니다 (65°C, 40분).
3) 현장검사: 실험실에서 고가의 장비를 이용한 검출 뿐만 아니라 현장에서는 보다 저렴한 휴대용등온핵산증폭기 (HARU-2000, 에스엠선전자 (주))를 이용하여 ASGV 바이러스를 검출할 수 있습니다.

3. 제품 구성

Table with 5 columns: 번호, 명칭, 두께, 수량 / 50 회분. Rows include 2x LAMP Enzyme Mixture, ASGV-CP Primer Mixture, ASGV-CP Positive Control, Molecular Grade Water, and LAMP Dye.

4. 필요 구성물 (제공되지 않음)

실험용 파이펫 및 팁/ 살균용 70% 에탄올/ 실험용 일회용 장갑/ 교반기/ 8-STRIP용 원심분리기/등온핵산증폭기/ CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad)/Applied Biosystems 7500 Fast real time PCR instrument system (Thermo Fisher Scientific)/ 그외 일반적인 실험실 장비

5. ASGV 바이러스 RNA 분리

* 상용화된 키트를 이용하거나 실험자에게 익숙한 방법으로 ASGV RNA를 추출하여 본 키트에 적용합니다.

6. LAMP 반응

1) ASGV 바이러스 검출을 위한 LAMP 반응액은 아래표와 같이 준비합니다.

Table with 2 columns: Reagent, Volume. Lists components like 2x LAMP Enzyme Mixture, ASGV-CP Primer Mixture, RNA sample, LAMP dye, Molecular Grade Water, and Total volume of 20 µl.

- 2) RNA sample은 1-2 µl 넣어줍니다.
3) 매 실험마다 양성대조군과 음성대조군 (종류수)를 함께 반응시켜 줍니다.

A. HARU-2000 사용시

- 1) 노트북과 HARU-2000을 연결합니다.
2) HARU-2000을 켜고 LAMP 프로그램을 선택합니다.
3) 노트북에서 HARJ_RealTimeChartViewer를 실행시키고 표시창에서 Logging을 선택하여 Start를 누릅니다.
4) 표시창에서 Setting-> Network -> Connect 눌러서 노트북과 기기를 연결합니다.
5) HARU-2000에 검사 PCR 튜브를 넣고 시작 버튼을 누릅니다.
6) 결과는 실시간으로 노트북에서 보실 수 있습니다.

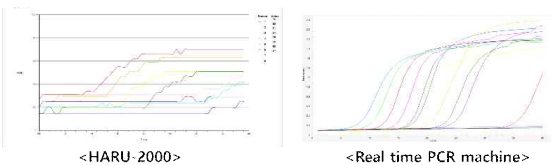
B. Real time PCR machine 사용시

1) 표와 같이 셋팅합니다.

Table with 6 columns: Step, No. of Cycle, Temperature, Duration, Threshold setting, Fluorophore. Shows settings for 40 cycles at 65°C for 45 seconds with Auto threshold and FAM fluorophore.

2) 시작 버튼을 누릅니다.

<반응예>



7. LAMP 결과 분석

Table with 4 columns: Case, Positive control, Negative control, Interpretation (Ct value). Shows results for ASGV Positive, ASGV Negative, and Invalid result / retest.

8. 사용상의 주의 사항

- 1) 본 제품은 연구용입니다.
2) 감염 및 미지의 질병을 일으킬 수 있는 위험성을 내포하고 있는 검체를 취급할 시에는 실험전에 실험 할 예정인 장소에 비닐 매트나 이에 상응하는 깔개를 깔아 놓은 다음 실험을 시작하여 실험 종결 후 폐기물은 121°C에서 15분 동안 가열한 다음 생물학적 위험성 물질로 간주하여 폐기 처분함으로써 감염적 접촉자의 감염 및 실험 결과물에 의한 차후 실험 결과의 오류를 예방하여야 합니다.
3) 본 제품 및 검체를 다루는 동안 항상 마스크와 실험용 일회용 장갑 또는 비닐 장갑을 착용하여야 합니다.
4) 본 제품의 서로 다른 lot의 시약을 섞어서 사용하지 말아야 합니다.
5) 본 제품의 어떤 구성 시약일지라도 입으로 가져가지 말아야 합니다.
6) 본 제품 및 검체를 다루는 동안 흡연, 음식물 섭취 및 음주수 섭취를 하지 말아야 합니다.
7) 본 제품 및 검체를 다루는 동안 주변에 주사바늘이나 칼 등 사용자에게 상해를 입힐수 있는 기구를 놓쳐 말아야 하며, 이와 같은 기구를 사용하지 않으므로써 안전사고를 방지하여야 합니다.
8) 본 제품의 구성 시약 및 검체를 조심스럽게 다루어 용기 뚜껑을 개봉 시 분무현상이 일어나지 않게 하고, 마스크를 착용함으로써 시약 및 검체들이 입에 튀어 묻는 것을 방지하여야 합니다.



<그림 1-25> Insert of ASGV real time LAMP detection kit.



<그림 1-26> Development of ASGV eye detection kit.

Revision No.: Sp_ASGV_Eye_LAMP-0001
 Issue Date: Oct. 16, 2021
 User Manual
 For Research Use Only

Manufactured by Speegenebio Co.
 rainlee67@naver.com Tel: +82-10-8621-2676
 553 Sanseongdae-ro Sujeong-gu Seongnam-si Gyeonggi-do
 #608 Euljikkwan Eulji University 13135 Republic of Korea

1. 제품 설명

ASGV Eye Detection Kit는 LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 기법을 이용하여 등온 조건에서 국내에서 유행하는 Apple stem grooving virus 유전자를 증폭할 수 있도록 구성된 제품입니다. LAMP는 strand displacement DNA synthesis 기능을 가지는 *Bst* polymerase를 이용하여 6개의 프라이머에 의해 반응이 이루어집니다. 먼저 내부 프라이머가 DNA에 결합하여 신장되면서 strand displacement가 발생하며 먼저 형성된 가닥은 떨어져 나오게 됩니다. 떨어져 나온 단일가닥의 5' 말단에 서부터 loop 구조가 형성되며 이는 3' 말단에서도 같은 과정이 반복되고 loop 구조가 신장되게 됩니다. LAMP를 수행하기 위해서는 증폭시킬 유전자의 6개의 위치를 인식하도록 특별히 고안된 4개의 프라이머를 사용하게 됩니다. 이는 일반 PCR이 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때, LAMP는 타겟 DNA에 대한 특이성이 매우 높아 짐을 의미합니다. 본 제품은 ASGV의 coat protein을 증폭후 육안으로 결과를 판독할 수 있도록 디자인된 제품입니다.

2. 제품 특성

- 고특이성 검사: 일반 PCR보다 2개의 위치를 인식하는 것과 비교했을 때 LAMP의 경우 6개의 유전자 위치를 인식하도록 프라이머를 설계하기 때문에 타겟 DNA에 높은 특이성을 가지고 있습니다.
- 경제적 검사: 등온 증폭의 특징상 온도 변화에 따른 DNA의 손실 및 손상이 없기 때문에 증폭효율이 매우 높으며 온도조절이 필요없기 때문에 상대적으로 반응시간이 짧아집니다 (65°C, 40분).
- 현장검사: 일정한 온도만 유지하면 되기 때문에 고가의 장비가 필요 없어 비교적 간단한 장비만을 가지고 반응이 가능하며 경우에 따라 전기영동 없이 dye 염색법으로 실험결과 도출이 가능하므로 실험실 내에서의 환경이 아니라더라도 현장에서 ASGV 유전자의 검출이 가능합니다.

3. 제품 구성

번호	명칭	뚜껑	수량 / 50 회분
1	2x Color LAMP Enzyme Mixture	ENZ	520 µL, 1개
2	ASGV-CP Primer Mixture	PRM	210 µL, 1개
3	ASGV-CP Positive Control	POS	25 µL, 1개
4	Molecular Grade Water (DW)	DW	300 µL, 1개

4. 필요 구성물 (제공되지 않음)

실험용 파이프 및 팁/ 살균용 70% 에탄올/ 실험용 일회용 장갑/ 교반기/ 8-STRIP용 원심분리기/ 등온핵산증폭기/ 그외 일반적인 실험실 장비

5. ASGV RNA 분리

* 상용화된 키트를 이용하거나 실험자에게 익숙한 방법으로 ASGV RNA를 추출하여 본 키트에 적용됩니다.

6. LAMP 반응

- ASGV 검출을 위한 LAMP 반응액은 아래표와 같이 준비합니다.

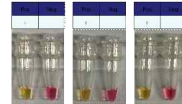
Reagent	Volume
2x Color LAMP Enzyme Mixture	10 µL
ASGV-CP Primer Mixture	4 µL
RNA sample	1-2 µL
Molecular Grade Water (DW)	4-5 µL
Total	20 µL

- RNA sample은 1-2 µL 넣어줍니다.
- 매 실험마다 양성대조군과 음성대조군 (증류수)를 함께 반응시켜 줍니다.
- 등온핵산증폭기를 켜고 LAMP 프로그램을 실행시킵니다.
- 등온핵산증폭기의 온도가 65°C에 도달하면 튜브를 넣고 40분 동안 반응시킵니다.
- 결과는 육안으로 관찰합니다.

7. LAMP 결과 분석

- 음성대조군은 붉은색 혹은 핑크빛으로 보입니다.
- 양성대조군은 노란색으로 보입니다.
- 색의 구분이 불분명할 경우 재 반응합니다.
- 예상되는 양성시료의 색이 변하지 않을 경우, 60분까지 반응을 시킵니다.
- 음성대조군이 노란색으로 변하면 재반용합니다.
- 음성대조군이 재반용여도 노란색으로 변하면 실험환경의 오염원 제거하는 작업이 필요합니다.
- 양성대조군의 색이 핑크빛이면 재반용합니다.
- 상기 기준이 부합하지 않을 경우, 실험자의 경험과 실험환경에 따라서 양성 판정기준을 따로 설정하셔도 됩니다.

<반응 예>



8. 사용상의 주의 사항

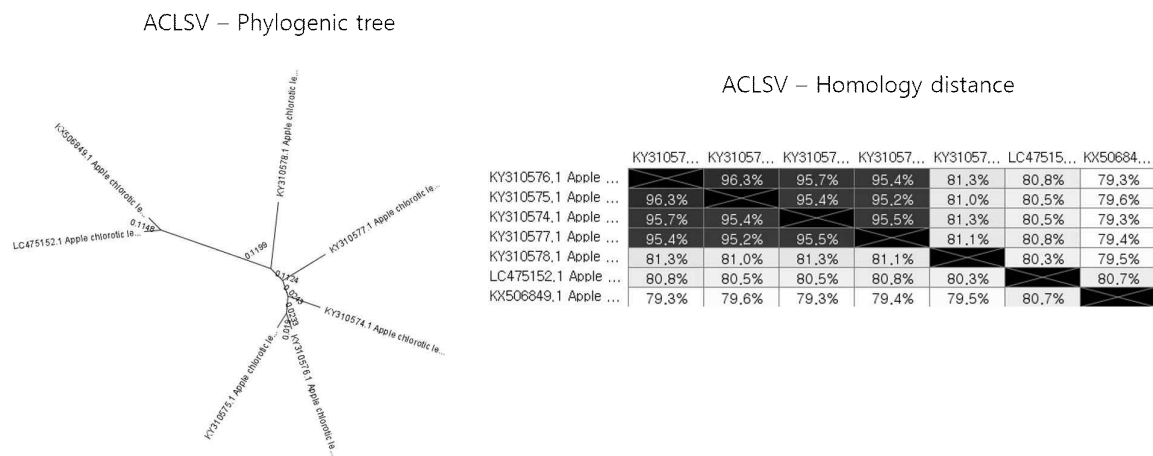
- 본 제품은 연구용입니다.
- 감염 및 미지의 질병을 일으킬 수 있는 위험성을 내포하고 있는 검체를 취급할 시에는 실험전에 실험 할 예정인 장소에 비닐 매트나 이에 상응하는 깔개를 깔아 놓은 다음 실험을 시작하여 실험 종결 후 폐기물은 121°C에서 15분 동안 가열한 다음 생물학적 위험성 물질로 간주하여 폐기 처분함으로써 간접적 접촉자의 감염 및 실험 결과물에 의한 차후 실험 결과의 오류를 예방하여야 합니다.
- 본 제품 및 검체를 다루는 동안 항상 마스크와 실험용 일회용 장갑 또는 비닐 장갑을 착용하여야 합니다.
- 본 제품의 서로 다른 lot의 시약을 섞어서 사용하지 않아야 합니다.
- 본 제품의 어떤 구성 시약이라도 입으로 가져가지 않아야 합니다.
- 본 제품 및 검체를 다루는 동안 흡연, 음식물 섭취 및 음료수 섭취를 하지 않아야 합니다.
- 본 제품 및 검체를 다루는 동안 주변에 주사바늘이나 칼 등 사용자에게 상처를 입힐수 있는 기구를 놓지 않아야 하며, 이와 같은 기구를 사용하지 않음으로써 안전사고를 방지하여야 합니다.
- 본 제품의 구성 시약 및 검체를 조심스럽게 다루어 용기 뚜껑을 개봉 시 분무현상이 일어나지 않게 하고, 마스크를 착용함으로써 시약 및 검체가 입에 튀어 묻는 것을 방지하여야 합니다.

2. Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) - RPA probe 진단제 개발

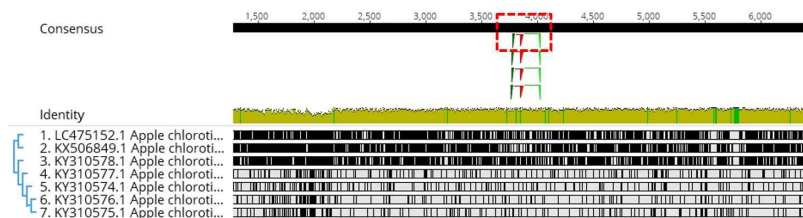


<그림 1-28> Symptoms of Apple chlorotic leafspot virus.

1) ASCLV (7 Korean isolates) 에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인



<그림 1-29> Phylogenic tree and homology distance of 7 ACLSV Korean isolate sequences.



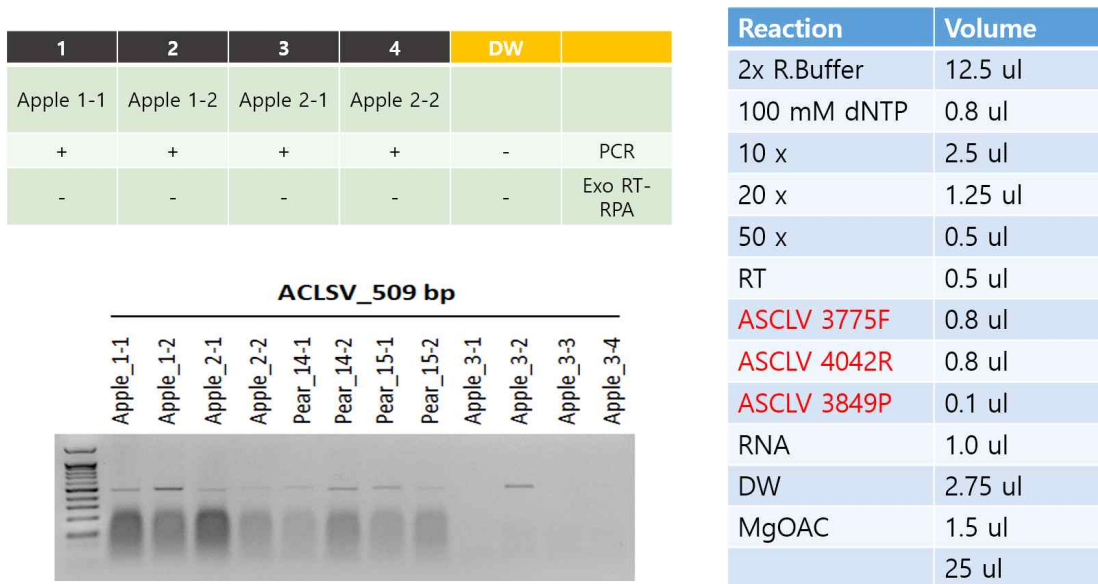
<그림 1-30> Region of primer and probe set No.1 of ACLSV Korean isolate sequences.

1. ASCLV-3775F :
5'- ATGAATGACTTTATTGGCATAGATGAACAA -3'

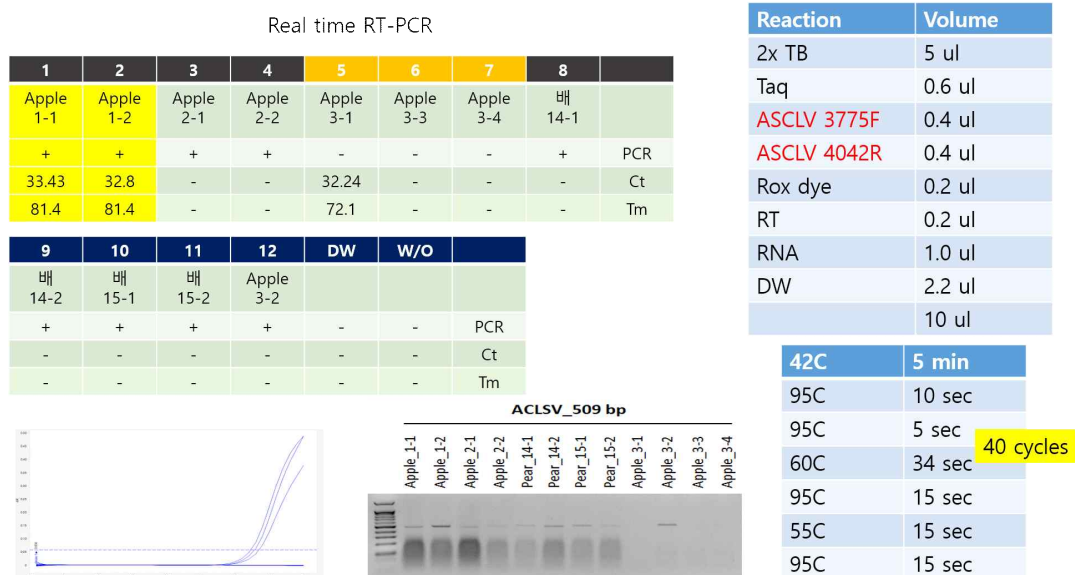
2. ASCLV-3849P :
5'- TTC ATG GAA AGA AAG GGA ATC ACA TAG AAG [FAM-dT] AA [THF] TC [BHQ1-dT]
TGT TGC CAG CAT GGT -[3'-block]

3. ASCLV-4042R:
5'- TTCTAAATCTTGTTATTGCCACCATTATGT-3'

<그림 1-31> Candidate of primer and probe set No.1 of ACLSV Korean isolate genes.



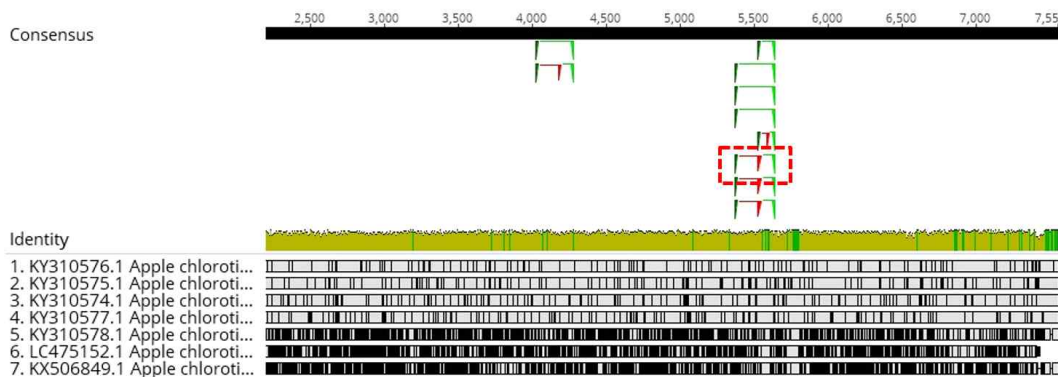
<그림 1-32> Result of RT-PCR and Exo-RT-RPA with ACLSV Korean isolate primer probe set No.1.



<그림 1-33> Result of real time RT-PCR with primer set only from ACLSV Korean isolate primer probe set No.1.

- ACLSV full Korean isolates 7건에 대한 유전자를 분석한 결과, 한국 분리주임에도 불구하고, 4개가 한 그룹이 되었고 나머지 3개는 grouping이 전혀되지 않을 정도로 유전자가 많이 달랐다 (그림 1-29).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 한개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 (빨간색 점선 박스), 이를 (Primer probe set No. 1; ASCLV-3775F, ASCLV-3849P, ASCLV-4042R)를 평가하였다 (그림 1-30, 31).
- RPA Exo kit를 사용하여 4개의 ACLSV 양성시료를 Primer probe set No.1과의 반응성 여부를 확인하였다 (그림 1-32).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰으나 전혀 반응이 없어 프로브에 문제가 있는 것으로 판단하여 프라이머 세트만으로 다음 실험을 수행하였다 (그림 1-32).
- Probe를 제외하고 primer set만으로 real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료로 반응시킨 결과, 2건의 양성시료에서 양성반응을 보였고, 한건의 음성시료에서 양성반응을 보였다 (그림1-33).

2) ASCLV2 (7 Korean isolates) full sequence에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인



<그림 1-34> Region of primer and probe set No.2 of ACLSV full Korean isolate sequences.

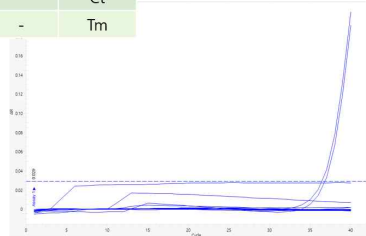
1. ASCLV2-5,373F
5'-TATCCTGAATAAGTTGAGTTTAAAAGCGAAA -3'
2. ASCLV2- 5,525P :
5'- TGG GAG GTT AAT GGA TGT GAT AGA CTC ATA [FAM-dT] T [THF] C[BHQ1-dT]
TGG AAT TTT CAT TC G -[3'-block]
3. ASCLV2-5,651R :
5'- TTATTTCTTATGAAGAACCTTGCAAAACCT -3'

<그림 1-35> Candidate of primer and probe set No.2 of ACLSV full Korean isolate genes.

Eco48 - Real time RT-qPCR – ACLSV2

1	2	3	4	5	6	7	8	ACLSV2
Apple 1-1	Apple 1-2	Apple 2-1	Apple 2-2	Apple 3-1	Apple 3-3	Apple 3-4	배 14-1	
+	+	+	+	-	-	-	+	PCR
-	-	-	-	36.4	-	-	-	Ct
-	-	-	-	73.9	-	-	-	Tm

9	10	11	12	DW	ACLSV2
배 14-2	배 15-1	배 15-2	Apple 3-2		
+	+	+	+	-	PCR
-	-	36.78	-	-	Ct
-	-	76.6	-	-	Tm



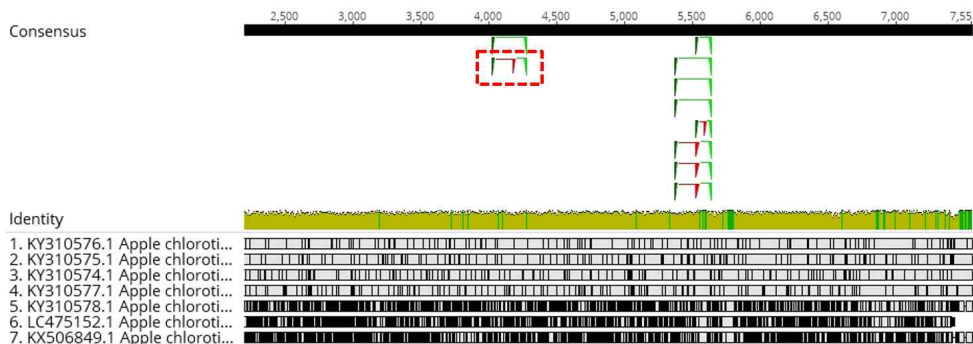
Reaction	Volume
2x TB	5 ul
Taq	0.6 ul
ACLSV2 5373F	0.4 ul
ACLSV2 5651R	0.4 ul
Rox dye	0.2 ul
RT	0.2 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.2 ul
	10 ul

42C	5 min
95C	10 sec
95C	5 sec
60C	34 sec
95C	15 sec
55C	15 sec
95C	15 sec

<그림 1-36> Result of real time RT-PCR with primer set only from ACLSV full Korean isolate primer probe set No.2.

- 한국분리주의 전체 유전자에 대하여 Primer 3 프로그램의 조건을 달리하여 primer를 디자인 한 결과, 두 영역에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중 하나를 선택 (빨간색 점선 박스), 이를 (Primer probe set No. 2; ASCLV2-5373F, ASCLV2-5525P, ASCLV2-5651R)를 평가하였다 (그림 1-34, 35).
- Probe를 제외하고 primer set만으로 real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료로 반응시킨 결과, 1건의 양성시료에서 양성반응을 보였고, 한건의 음성시료에서 양성반응을 보였다 (그림1-36).

3) ASCLV3 (7 Korean isolates) full sequence에 대한 프라이머 프로브 디자인



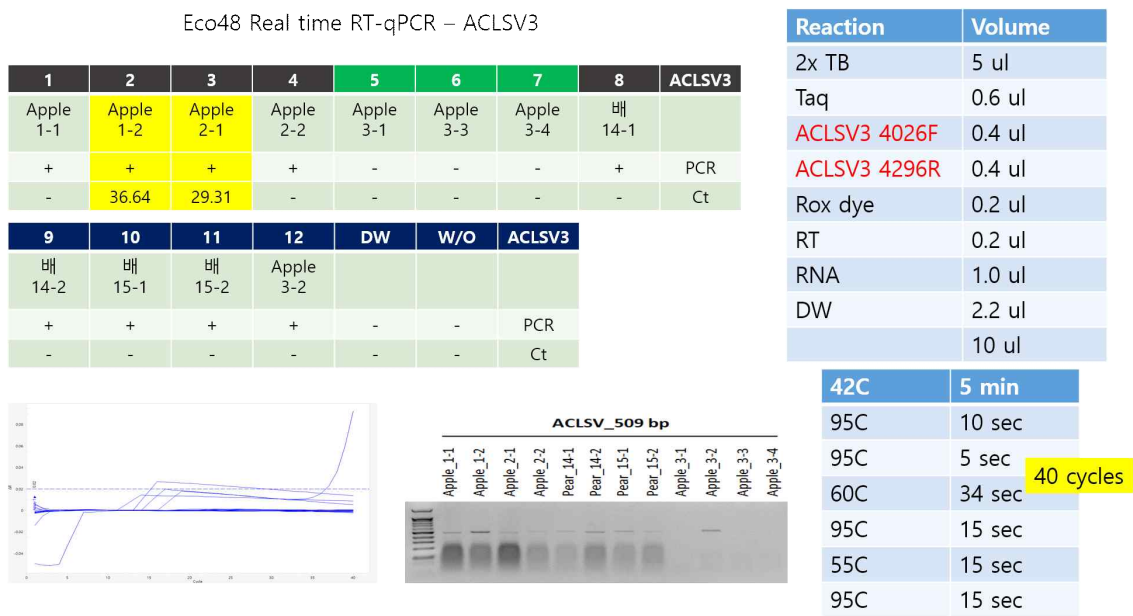
<그림 1-37> Region of primer and probe set No.3 of ACLSV full Korean isolate sequences.

1. ACLSV3-4,026 F
5'-AATAACAAGATTTAGAAGAGGTTTCTGCTTT-3'

2. ACLSV3- 4,175 P
5'-TTAATCTTATTCTGAGTGAAAAGGACATTACCAAA-3'
5'- ATT CAT CCT GGG ATC CTC CTC TGT TAA TCT [FAM-dT] A [THF] TC [BHQ1-dT] G
AGT GAA AAG GAC ATT -[3'-block]

3. ACLSV3-4,296 R
5'- ATATCTCTTTCCAAGGTATATCATGCTCTTA -3'

<그림 1-38> Candidate of primer and probe set No.3 of ACLSV full Korean isolate genes.

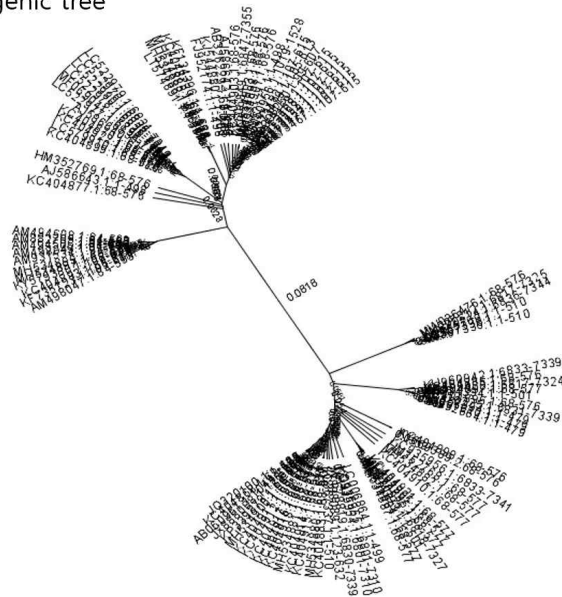


<그림 1-39> Result of real time RT-PCR with primer set only from ACLSV full Korean isolate primer probe set No.3.

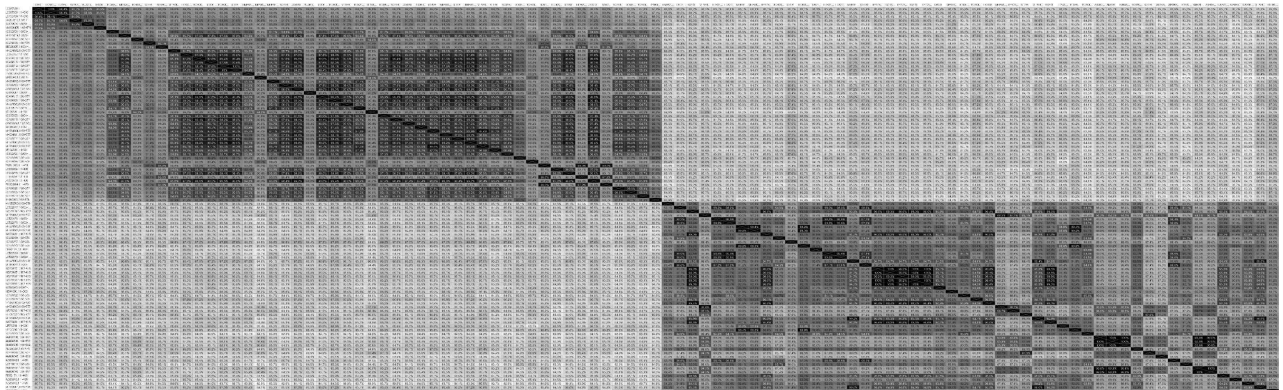
- 한국분리주의 전체 유전자에 대하여 Primer 3 프로그램의 조건을 달리하여 primer를 디자인 한 결과, 두 영역에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중 하나를 선택 (빨간색 점선 박스), 이를 (Primer probe set No. 3; ASCLV3-4026F, ASCLV3-4175P, ASCLV3-4296R)를 평가하였다 (그림 1-37, 38).
- Probe를 제외하고 primer set만으로 real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료로 반응시킨 결과, 2건의 양성시료에서 양성반응을 보였다 (그림1-39).

4) ASCLV4-CP (101 isolates) sequence에 대한 프라이머 프로브 디자인

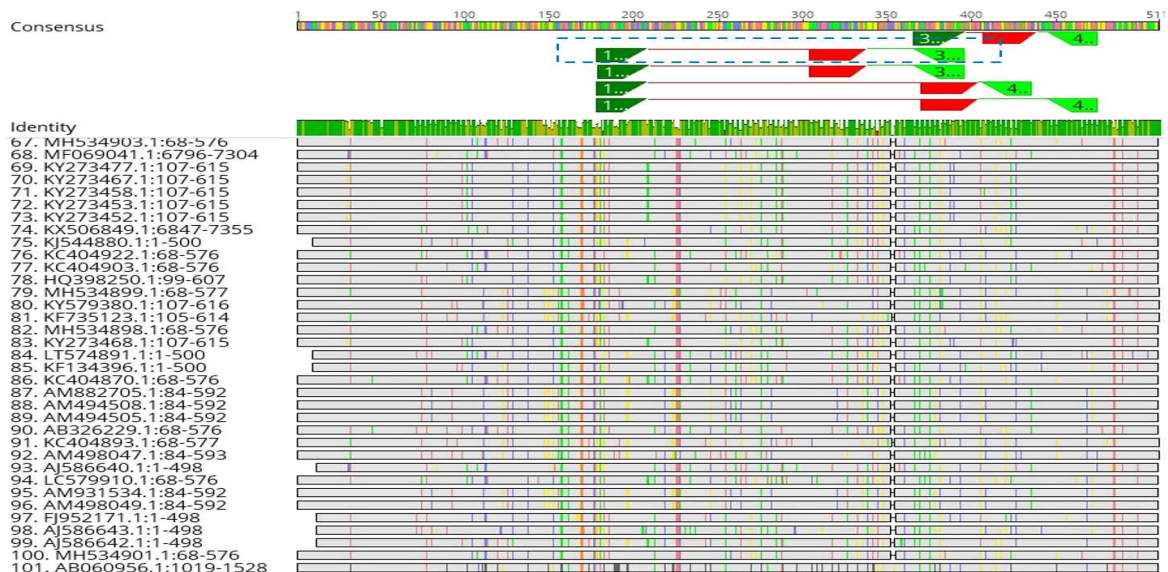
ASCLV4-CP Phylogenetic tree



<그림 1-40> Phylogenetic tree of 101 ASCLV-CP isolate sequences.



<그림 1-41> Homology distance of 101 ASCLV-CP isolate sequences.



<그림 1-42> Region of primer and probe set No.4 of 101 ASCLV-CP isolate sequences.

1. ACLSV4-CP-179F

5'-TCTTATCAAGATCTTCAAGACTACATCTTCG-3'

2. ACLSV4-CP-304P

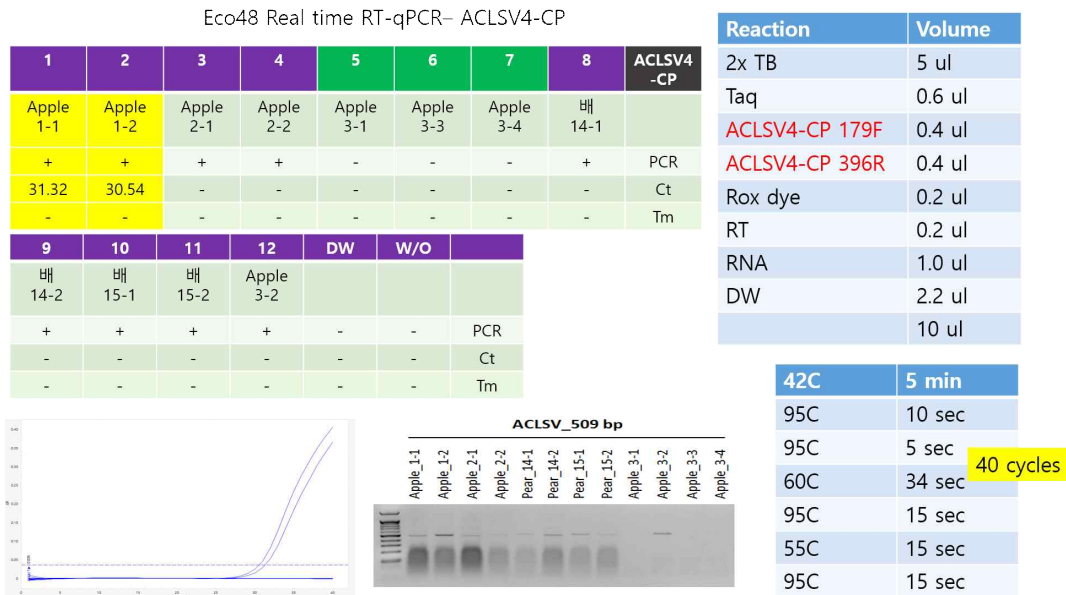
5'-TTTTACAAACCTCTTTTCTACCATGCCTGAAGTG -3'

5'- TGA AGT ACA AAG GGG TTT TCA CAA ACC TCT [FAM-dT] T [THF] C
[BHQ1-dT] ACC ATG CCT GAA GTG -[3'-block]

3. ACLSV4-CP-396R

5-TATAAACATATTCAGACCTTTGTTGAAGTCG-3'

<그림 1-43> Candidate of primer and probe set No.4 of ACLSV-CP isolate genes.



<그림 1-44> Result of real time RT-PCR with primer set only from 101 ACLSV-CP isolate primer probe set No.4.

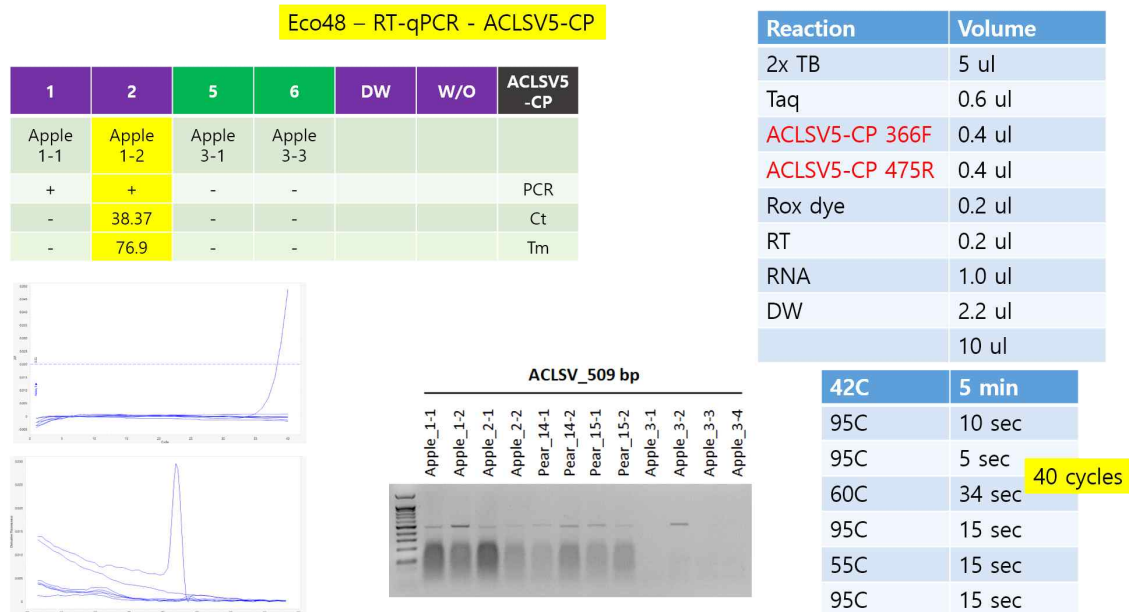
- ACLSV-CP isolates 101건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크기는 2개로 grouping이 되었다 (그림 1-40, 41).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중 하나를 임의로 선택 (빨간색 점선 박스), 이를 (Primer probe set No. 4; ASCLV4-CP-179F, ASCLV4-CP-304P, ASCLV4-CP-396R)를 평가하였다 (그림 1-42, 43).
- Probe를 제외하고 primer set만으로 real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료로 반응시킨 결과, 2건의 양성시료에서 양성반응을 보였다 (그림1-44).

5) ASCLV5-CP (101 isolates) sequence에 대한 프라이머 디자인

ACLSV5-CP 366 F: CGACTTCAACAAAGGTCTGAATATGTTTATA

ACLSV5-CP 475 R: CATTTTCACTCTTTGCAAATTCAGTTTGTA

<그림 1-45> Candidate of primer set No.5 of ACLSV-CP isolate genes.



<그림 1-46> Result of real time RT-PCR with 101 ACLSV-CP isolate primer set No.5.

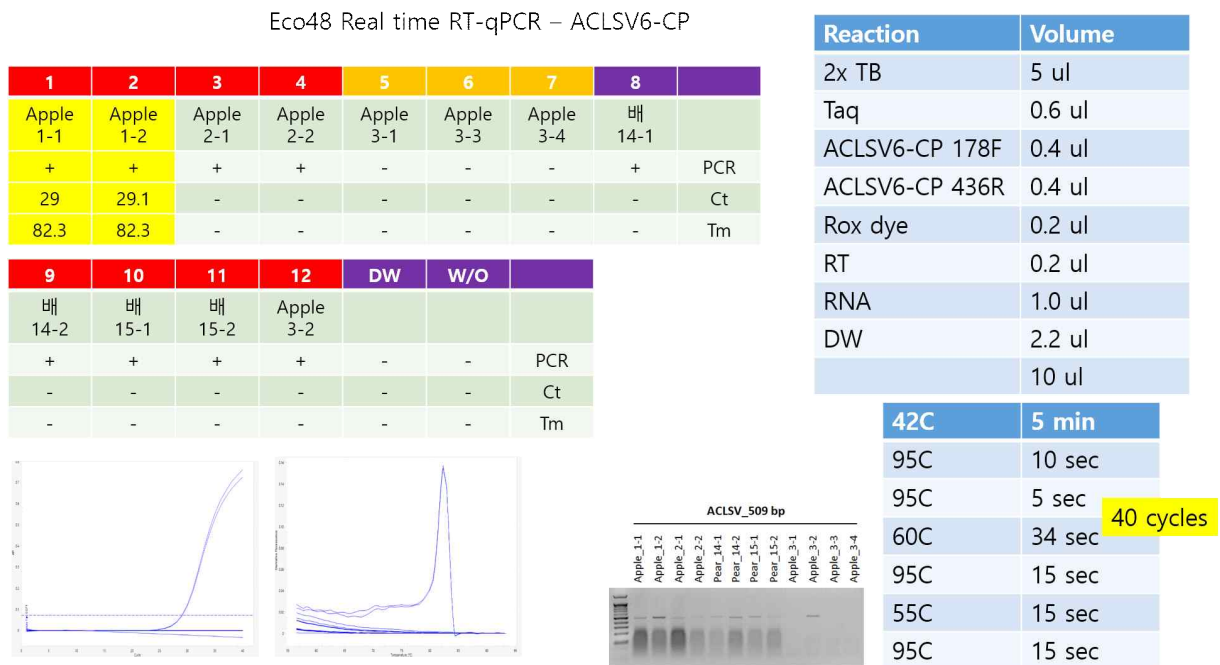
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에 또 다른 하나를 임의로 선택, 이를 (Primer set No. 5; ASCLV5-CP-366F, ASCLV5-CP-475R)를 평가하였다 (그림 1-45).
- Real time RT-PCR을 4건의 양성시료와 반응시킨 결과, 1건의 양성시료에서 양성반응을 보였다 (그림1-46).

6) ASCLV6-CP (101 isolates) sequence에 대한 프라이머 디자인

ACLSV6-CP 178 F: ATCTTATCAAGATCTTCAAGACTACATCTTC

ACLSV6-CP 436 R: GGTTTCATATTAGTTATTACTTTTTGCTGAGC

<그림 1-47> Candidate of primer set No.6 of ACLSV-CP isolate genes.



<그림 1-48> Result of real time RT-PCR with 101 ACLSV-CP isolate primer set No.6.

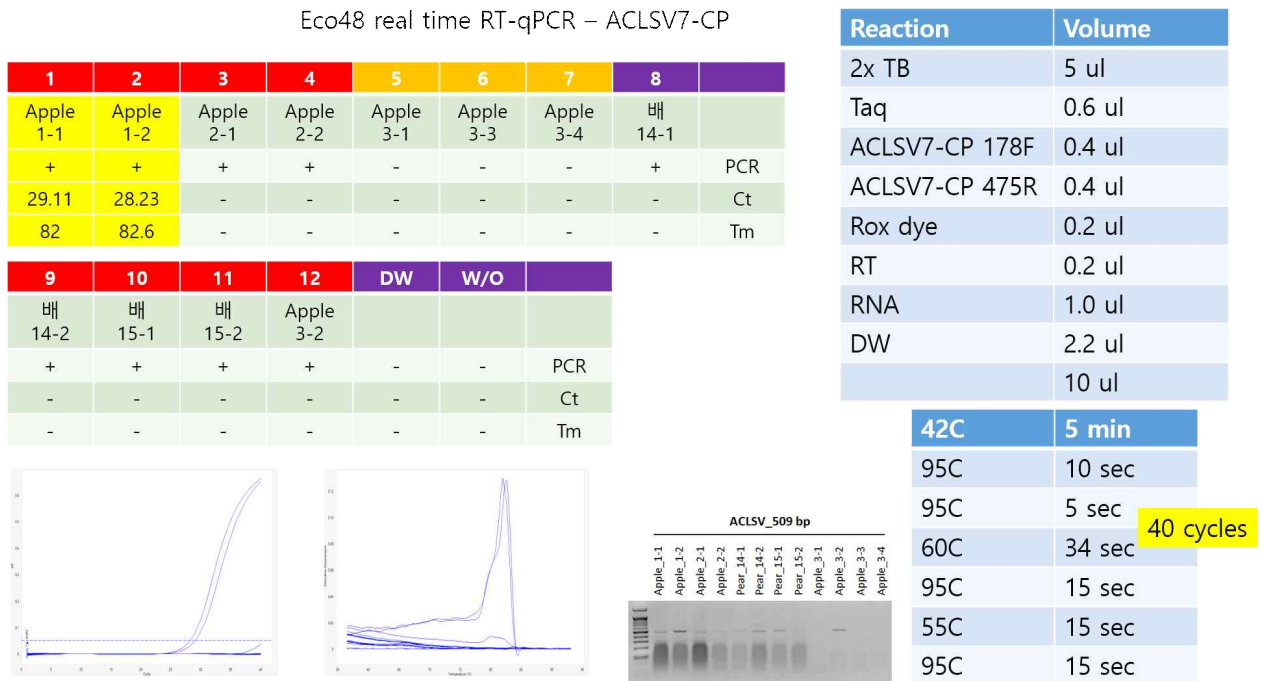
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에 또 다른 하나를 임의로 선택, 이를 (Primer set No. 6; ASCLV6-CP-178F, ASCLV6-CP-436R)를 평가하였다 (그림 1-47).
- Real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료와 반응시킨 결과, 2건의 양성시료에서만 양성반응을 보였다 (그림1-48).

7) ASCLV7-CP (101 isolates) sequence에 대한 프라이머 디자인

ACLSV7-CP 178 F: ATCTTATCAAGATCTTCAAGACTACATCTTC

ACLSV7-CP 475 R: CATTTTCACTCTTTGCAAATTCAGTTTGTA

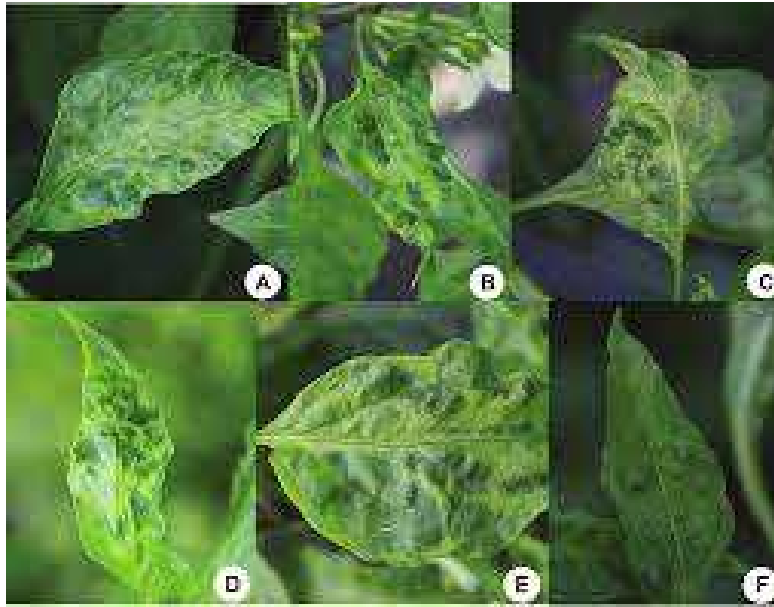
<그림 1-49> Candidate of primer set No.7 of ACLSV-CP isolate genes.



<그림 1-50> Result of real time RT-PCR with 101 ACLSV-CP isolate primer set No.7.

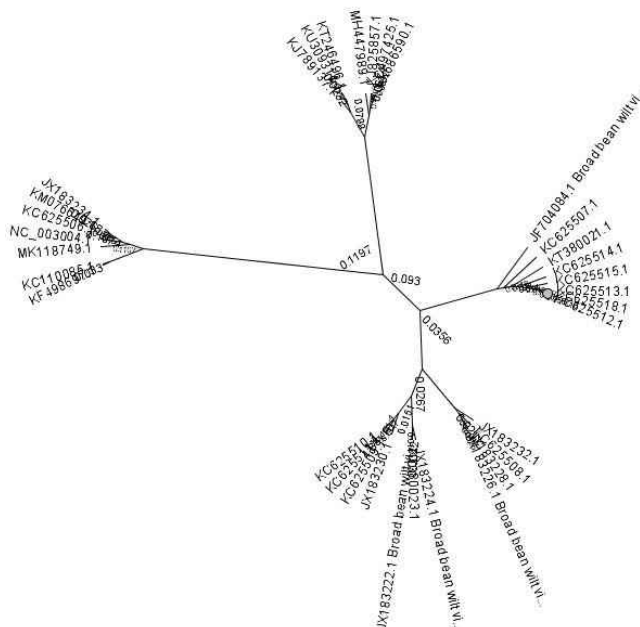
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에 또 다른 하나를 임의로 선택, 이를 (Primer set No. 7; ASCLV7-CP-178F, ASCLV7-CP-475R)를 평가하였다 (그림 1-49).
- Real time RT-PCR을 9건의 양성시료와 3건의 음성시료와 반응시킨 결과, 2건의 양성시료에서만 양성반응을 보였다 (그림1-50).

3. Broad bean wilt virus 2 (BBWV2) - RPA probe 진단제 개발

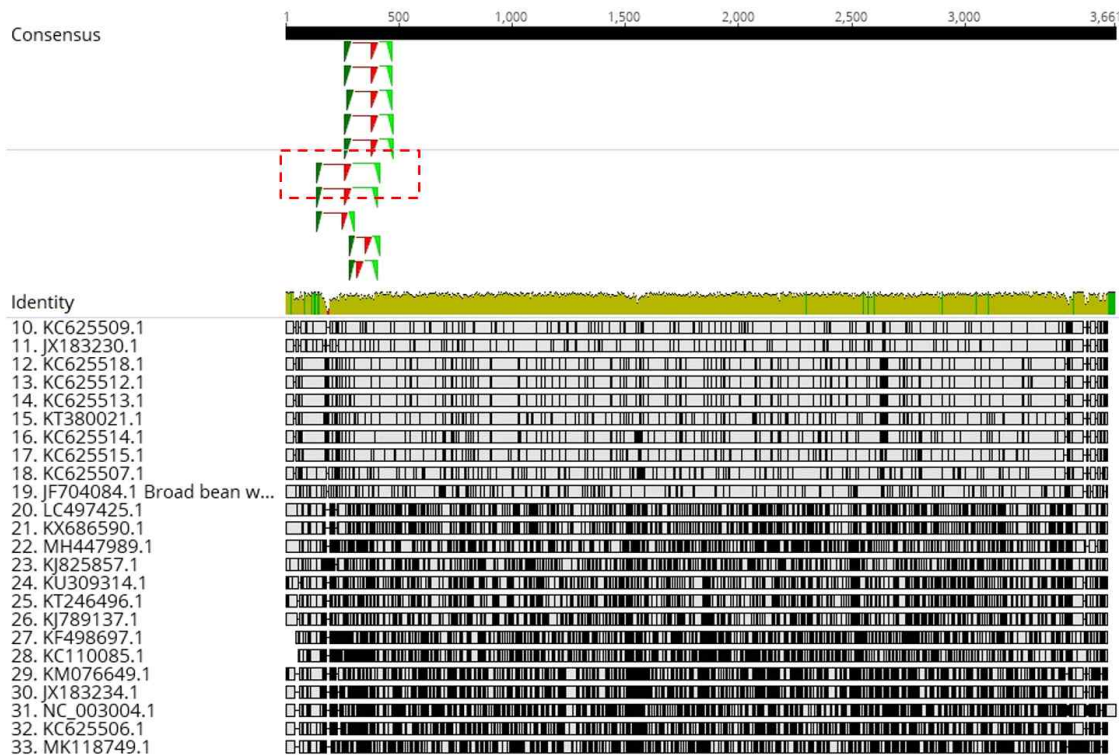


	JK1832	JK1832	KC625	JK1832	KT380	JK1832	JK1832	KC625	KC625	KC625	JK1832	KC625	KC625	KC625	KT380	KC625	KC625	KC625	JF7040	LC497	K0686	M4447	KJ8258	KJ309	KT246	KJ7891	HF498	KC110	MM076	JK1832	NC_000	KC625	MK118
JK18322.1	97.5%	96.2%	96.3%	94.7%	95.0%	94.5%	95.0%	95.0%	95.1%	95.6%	93.5%	93.5%	93.5%	93.1%	93.1%	93.5%	93.5%	93.5%	92.6%	93.6%	93.7%	92.6%	93.9%	94.4%	94.5%	94.1%	80.6%	80.6%	79.5%	78.9%	76.9%	78.9%	79.5%

<그림 1-51> Homology distance of 33 BBWV2 isolate sequences.



<그림 1-52> Phylogenetic tree of 33 BBWV2 isolate sequences.



<그림 1-53> Region of primer and probe set of 33 BBWV2 isolate sequences.

1. BBWV22-135F:

5'- GATTTAAAGCGCACCATATATTTTGAAACTT -3'

2. BBWV22-261P:

5'- CGT CCT GAA CTT GTT GCA GTG TTA GAT AGA [FAM-dT] A [THF] T [BHQ1-dT]
TTC AGA AAT CAT AAG-[3'-block]

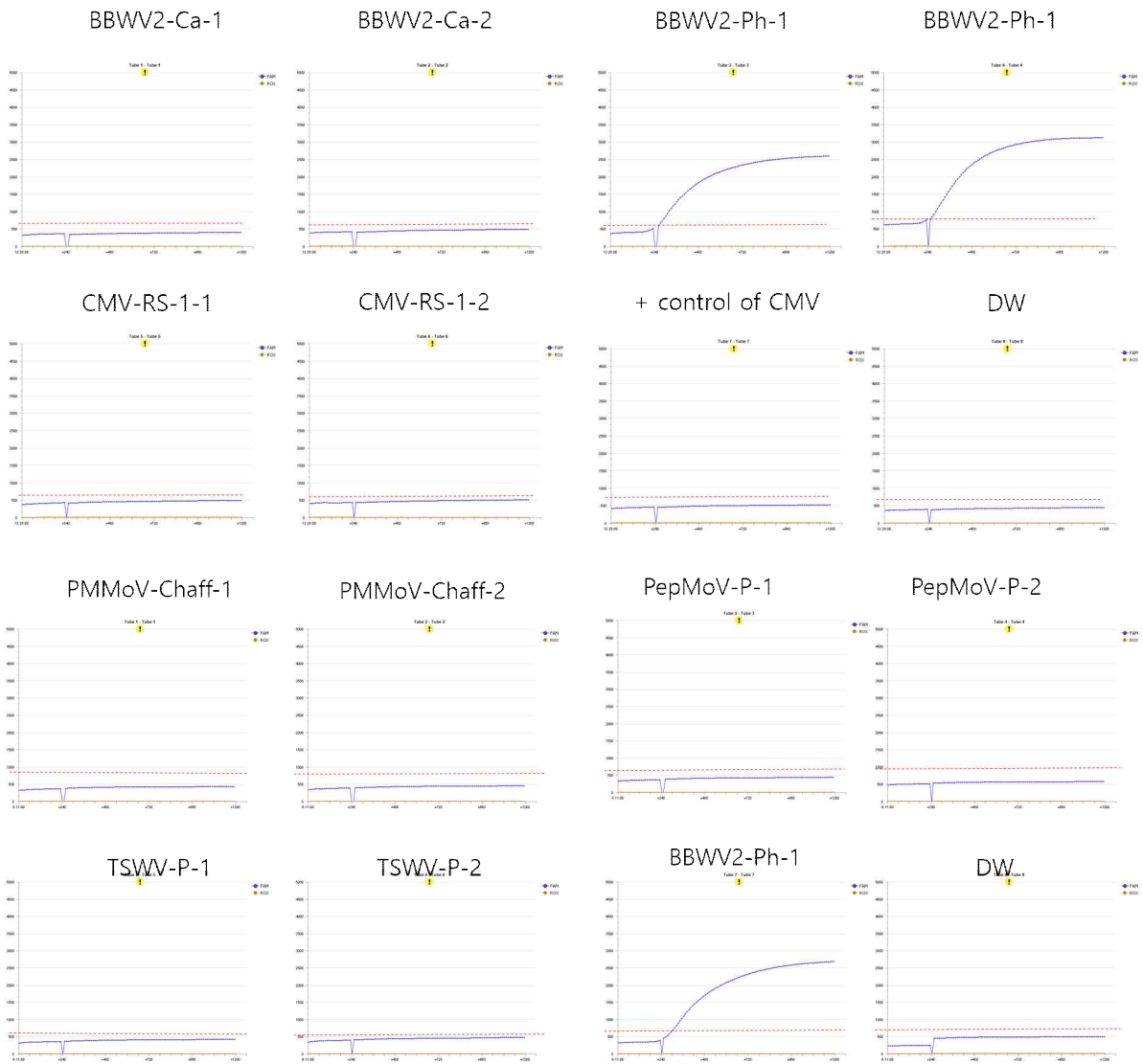
3. BBWV22-422R:

5'-TATGCAAATTCGATCCTCAATATGTAGTAAC-3'

<그림 1-54> Candidate of primer probe set of 33 BBWV2 isolate genes.

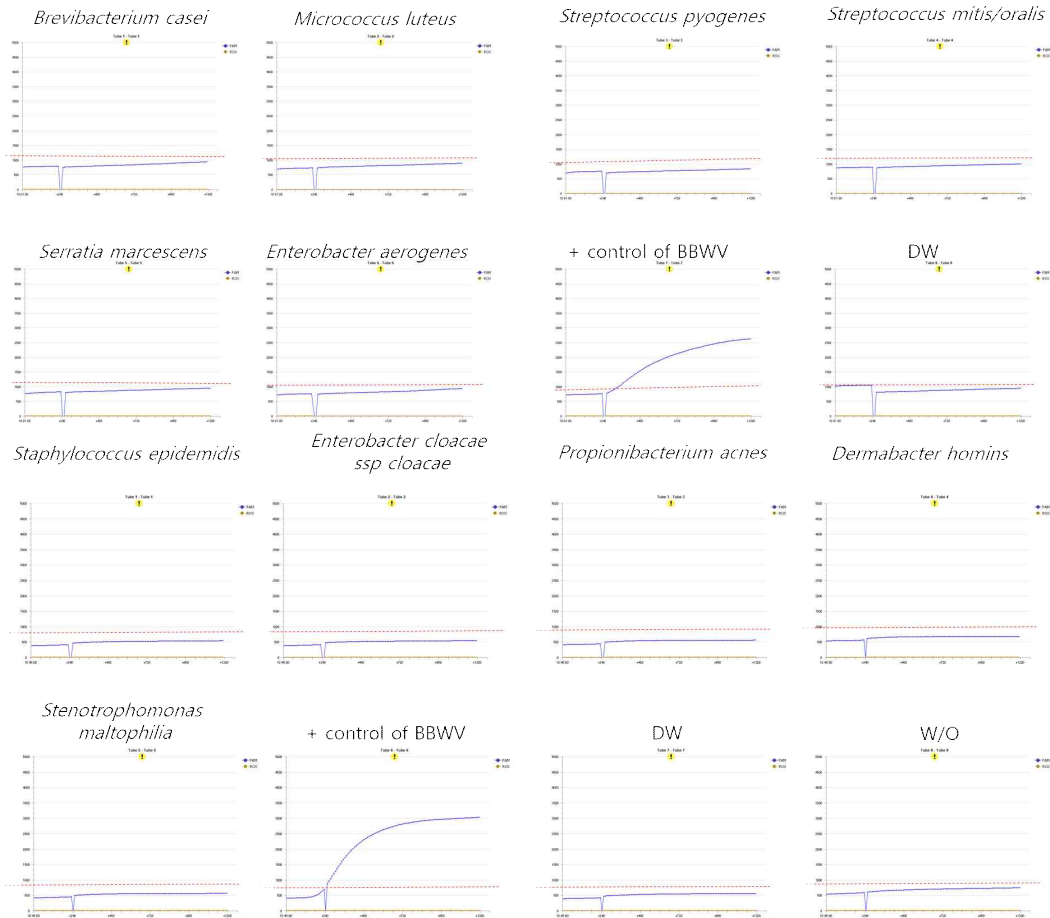
- BBWV2 isolates 33건에 대한 유전자를 분석한 결과, 5개의 그룹으로 나뉘었다 (그림 1-51, 52).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5 ' 쪽으로 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트 (빨간색 점선 박스)를 선택하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; BBWV22-135F, BBWV22-261P, BBWV22-422R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-53, 54).
- RPA Exo kit를 사용하여 5가지의 고추관련 바이러스들 (CMV, BBWV, PMMoV, PepMoV, TWSV) 과 교차반응을 조사한 결과, BBWV2에만 잘 반응하였다 (그림 1-55).
- Exo RT RPA 반응은 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수

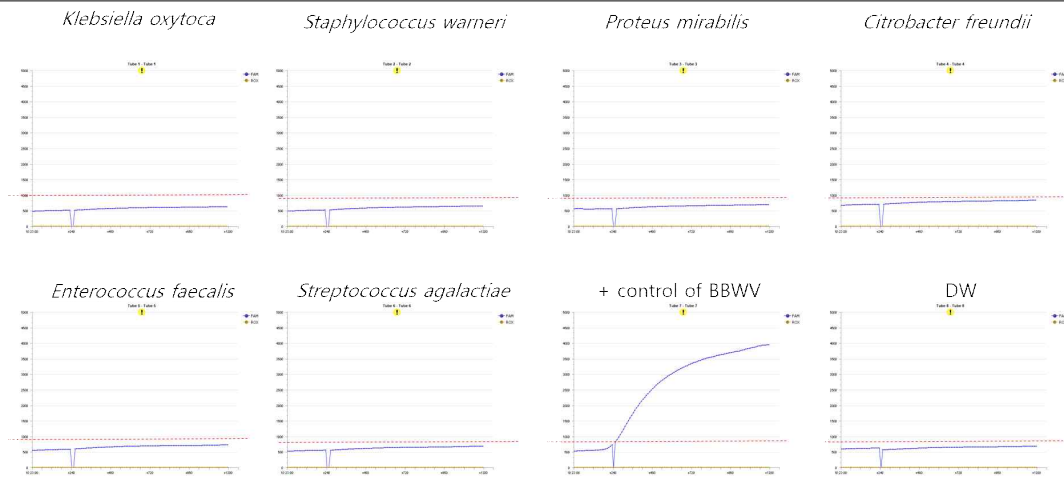
와는 반응이 없었다 (그림 1-55).



<그림 1-55> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of BBWV2 with several viruses.

Reagent	Volume	No	Bacteria	result
2xR.B	10 ul	1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
100mM dNTP	0.7 ul	2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
10x	2.0 ul	3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
20x	1.0 ul	4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
50x	0.4 ul	5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
RT	0.4 ul	6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
BBWV22-135F	0.7 ul	7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
BBWV22-422R	0.7 ul	8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
BBWV22-261P 1pM	1.5 ul	9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
MgOAC	1.6	10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
RNA	1.0 ul	11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
TOTAL	20 ul	12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
		13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
		14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
		15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
		16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
		17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
		18	Distilled water	Negative
		Positive control	BBWV2 - mRNA transcript	Positive





<그림 1-56> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of BBW2 with several bacteria.

- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 BBW2 primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-56).
- 이상의 결과로 RT-RPA BBW2 detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-57, 58).



<그림 1-57> BBW2 ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-BBWV2-ER-50

Broad Bean Wilt Virus 2 (BBWV2) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-BBWV2-ER-0001
Issue Date: Aug 13, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Backto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@naver.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Broad bean wilt virus 2 (BBWV2) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of segment RNA2 gene to detect the BBWV2 viral RNA from specimens.

4. Product Description

Broad bean wilt virus (BBWV) is the type species of the genus *Fabavirus* in the family *Comoviridae*. It is transmitted by aphids, mostly *Aphis gossypii* and *Myzus persicae*, with infection rate of 60–90% in a nonpersistent manner and has a wide host range. By serological and molecular studies, BBWV isolates are classified into two groups, *Broad bean wilt virus 1* (BBWV1) and *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2). Although they show the similar genome structures and functions, the nucleotide (nt) sequence identity between them was limited (39%–67%). The genome is composed of two single stranded positive-sense RNA molecules, RNA-1 and RNA-2, that are encapsidated separately into icosahedral virions. Although BBWV1 has not been detected yet, disease incidences caused by BBWV2 have been reported in Korea. BBWV2 RNA-1 and RNA-2 are about 6 kb and 4 kb nucleotides in length, respectively, contain a single open reading frame (ORF), and thus translated into a single polyprotein precursor from which functional proteins are produced by proteolytic cleavage. RNA-1 encodes five proteins containing cofactor protease (Co-pro), NTP-binding motif (NTBM), genome-linked viral protein (VPg), protease (Pro) and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) while RNA-2 encodes three proteins containing movement protein (MP), large coat protein (LCP) and small coat protein (SCP). Up to date, the complete nucleotide sequences of eight BBWV2 isolates and partial sequences of twenty-five BBWV2 isolates from various host plants have been reported. BBWV2 is a destructive pathogen in many economically important horticultural and ornamental crops, and has a worldwide distribution. In Korea, it has been reported that BBWV2 naturally infects red pepper, broad bean, pea, spinach, perilla, lily, *Gentiana* spp., gladiolus, celery, etc. Especially, occurrence of BBWV2 in red pepper has increased by single and mixed infection with *Cucumber mosaic virus* (CMV) and other viruses.

The Broad bean wilt virus 2 (BBWV2) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Broad bean wilt virus 2 by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the segment RNA2 gene for the unique amplification of the Broad bean wilt virus 2 RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	BBWV2 Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	BBWV2 Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	BBWV2 Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	BBWV2 Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5–1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	BBWV2 Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	BBWV2 Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	BBWV2 Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

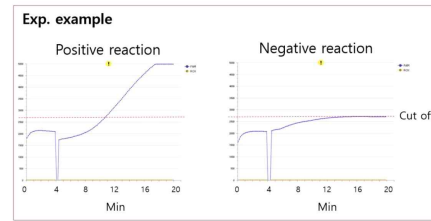
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of BBWV2 RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	Seg RNA2	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	BBWV2 Positive
2	+	-	-	BBWV2 Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-58> Insert of BBWV2 ER Detection kit.

■ BBWV2 nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. nfoBBWV22-135F:

5'- GATTTAAAGCGCACCATATATTTTGAAACTT -3'

2. nfoBBWV22-261P:

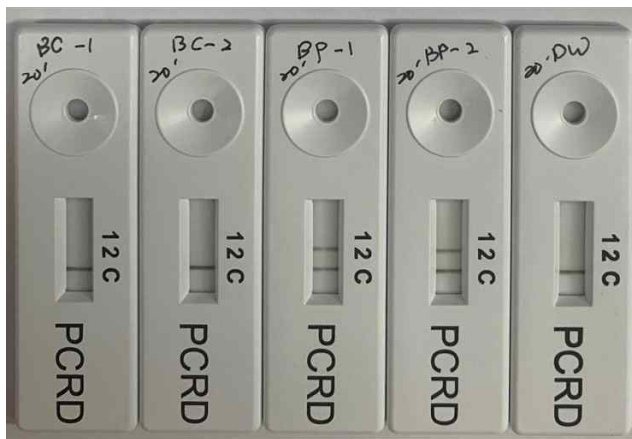
5'- [FAM] CGT CCT GAA CTT GTT GCA GTG TTA GAT AGA A dSpacer TT
TTC AGA AAT CAT AAG-Spacer C3-3'

3. nfoBBWV22-422R:

5'-[Biotin]TATGCAAATTCGATCCTCAATATGTAGTAAC-3'

<그림 1-59> RPA nfo primer probe set of BBWV2.

BBWV2 nfo kit test

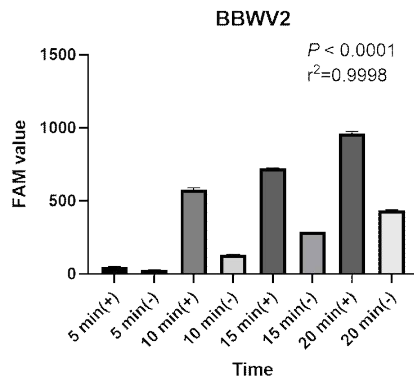


Primer free R buffer	29.5 ul
BBWV22-135F	2.1 ul
BBWV22-422R	2.1 ul
BBWV22-261P	0.3 ul
RT	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	11.5 ul
MgOAc	2.5 ul
Total	50 ul

<그림 1-60> RPA nfo-RT reaction of primer probe set of BBWV2 with BBWV2.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT BBWV2 primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-59).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39℃에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-60과 같이 nfo primer probe는 BBWV2 바이러스를 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

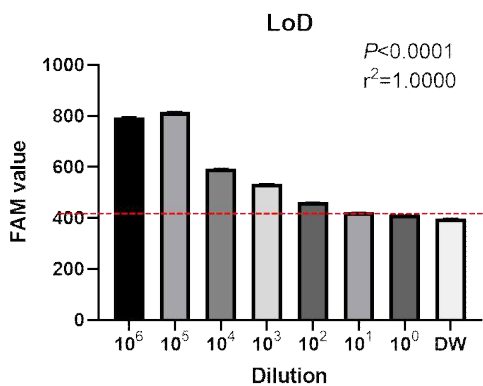
■ BBW2 end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x R.B	10
100 mM dNTP	0.7
10X B	2
20X B	1
RT	1
BBW2 nfo135F	0.5
BBW2 nfo422R	0.5
RNA	1.0
MgOAc	1.5
DW	1.8
Total	20

5 min(+)	5 min(-)	10 min(+)	10 min(-)	15 min(+)	15 min(-)	20 min(+)	20 min(-)
52	30	569	130	727	291	972	439
49	29	587	135	721	291	955	433

<그림 1-61> RPA end point reaction with primer set of BBW2 according to the time.



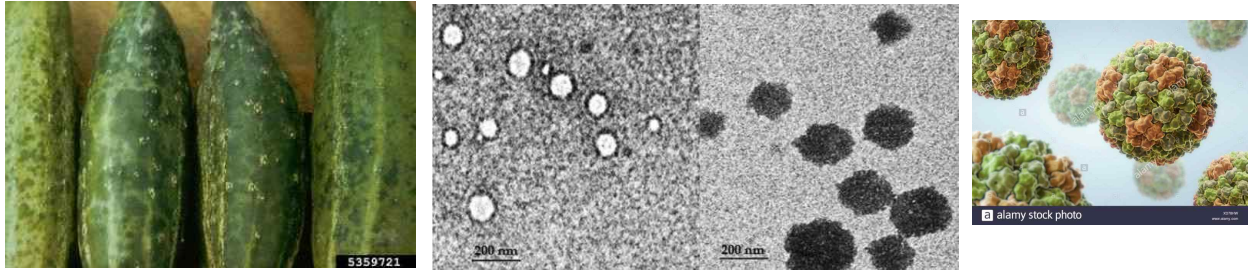
Reagent	Volume
2x R.B	10
100 mM dNTP	0.7
10X B	2
20X B	1
RT	1
BBW2 nfo135F	0.5
BBW2 nfo422R	0.5
RNA	1.0
MgOAc	1.5
DW	1.8
Total	20

10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
792	814	592	534	462	422	412	398
796	817	595	535	463	423	413	399

<그림 1-62> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of BBW2.

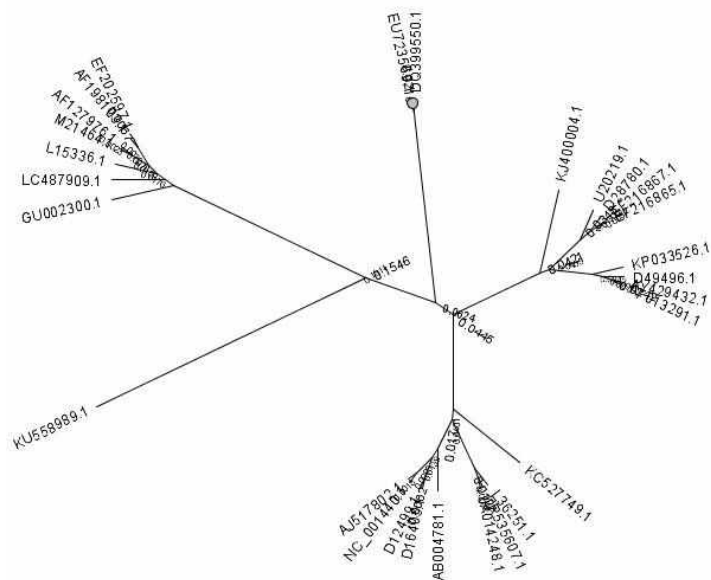
- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT BBW2 primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분후부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-61).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10² copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-62).
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

4. Cucumber mosaic virus (CMV) - RPA probe 진단제 개발

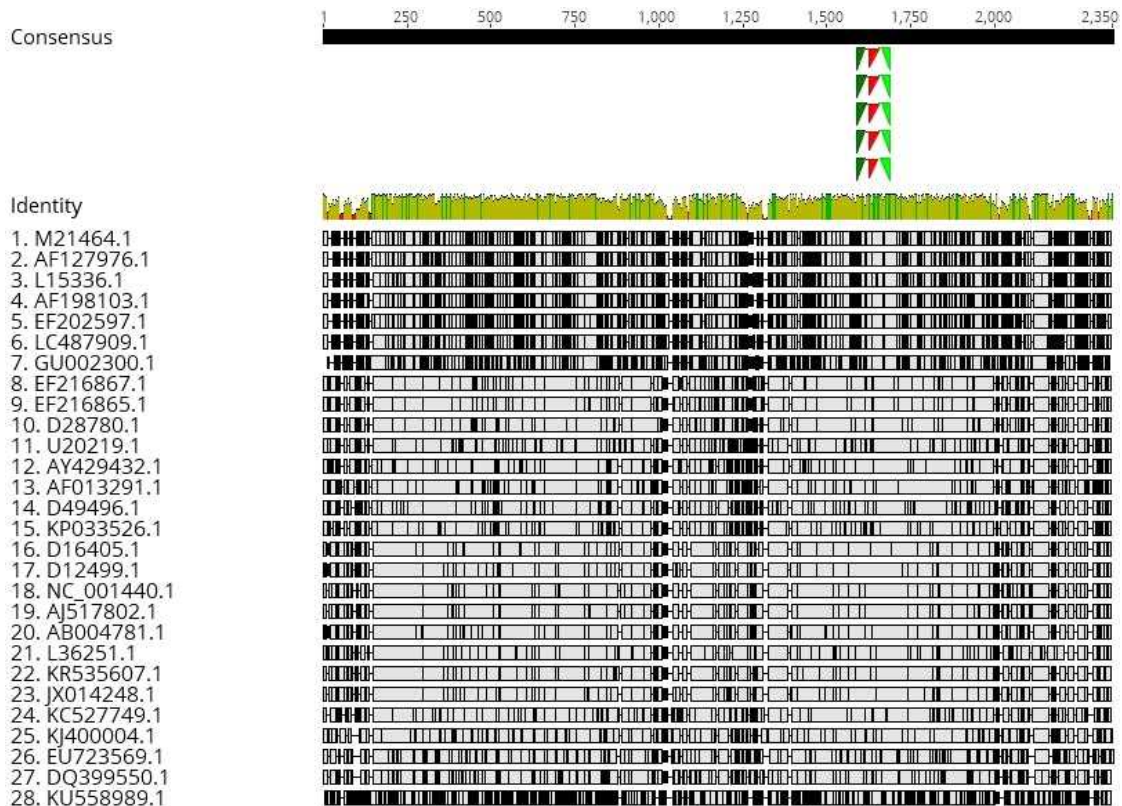


	M2146...	AF127...	L15336...	AF198...	EF202...	LC487...	GU002...	EF216...	EF216...	D2678...	U0201...	AH429...	AF013...	D4849...	KP033...	D1640...	D1249...	NC_000...	A5178...	AB004...	L36251...	KR555...	JK0142...	KC527...	KJ4000...	EU723...	DO399...	KU558...
M2146.1	99.5%	97.6%	98.0%	99.2%	97.5%	95.9%	71.8%	71.8%	72.0%	69.9%	71.2%	70.5%	71.5%	71.8%	71.7%	71.7%	71.8%	71.8%	71.7%	71.8%	72.1%	72.0%	72.0%	70.5%	71.1%	71.0%	64.7%	
AF127.1	99.5%	98.0%	98.1%	98.4%	97.4%	95.6%	71.8%	71.7%	71.8%	69.8%	70.9%	70.4%	71.3%	71.5%	71.5%	71.4%	71.5%	71.6%	71.4%	71.5%	71.4%	71.0%	71.8%	71.9%	70.5%	70.9%	70.8%	64.7%
L15336.1	97.6%	98.0%	98.2%	98.2%	97.2%	95.7%	71.8%	71.8%	71.9%	69.6%	71.1%	70.6%	71.5%	71.6%	71.5%	71.4%	71.5%	71.4%	71.4%	71.4%	71.2%	71.6%	71.6%	71.9%	70.5%	70.9%	70.8%	64.4%
AF198103.1	98.0%	98.1%	98.2%	98.1%	97.0%	95.7%	71.8%	71.6%	71.7%	69.9%	71.1%	70.6%	71.4%	71.5%	71.2%	71.1%	71.2%	71.2%	71.2%	71.2%	70.9%	71.6%	71.6%	71.8%	70.4%	70.7%	70.7%	64.2%
EF202597.1	98.2%	98.4%	98.2%	98.1%	97.1%	95.8%	72.2%	72.0%	72.1%	70.0%	71.2%	70.7%	71.8%	71.9%	71.7%	71.5%	71.6%	71.7%	71.7%	71.3%	71.9%	72.0%	72.2%	70.8%	71.3%	71.4%	64.5%	
LC487938.1	97.5%	97.4%	97.2%	97.0%	97.1%	97.4%	72.3%	72.3%	72.1%	70.0%	71.6%	70.9%	72.0%	71.9%	72.0%	71.9%	72.0%	72.0%	71.9%	71.7%	72.4%	72.4%	72.3%	70.7%	71.2%	71.2%	64.2%	
GU002300.1	95.9%	95.6%	95.7%	95.7%	95.6%	97.4%	71.5%	71.0%	71.4%	69.2%	70.6%	70.0%	71.1%	71.0%	71.3%	71.3%	71.3%	71.3%	71.3%	71.2%	70.9%	71.5%	71.6%	71.6%	71.0%	70.5%	70.5%	65.7%
EF216867.1	71.9%	71.8%	71.8%	71.8%	72.0%	72.3%	71.5%	98.9%	96.5%	92.4%	91.8%	91.2%	91.2%	92.4%	90.1%	90.4%	90.2%	90.4%	90.2%	89.7%	89.8%	89.8%	89.8%	90.4%	89.5%	89.0%	88.9%	
D28780.1	71.0%	71.7%	71.8%	71.8%	72.0%	72.3%	71.4%	98.5%	96.6%	92.6%	92.4%	91.5%	91.1%	92.6%	90.1%	90.4%	90.3%	90.5%	90.1%	89.0%	90.3%	90.5%	90.2%	89.9%	89.5%	89.4%	88.9%	
U02021.1	69.9%	69.8%	69.8%	69.9%	70.0%	70.0%	69.2%	92.4%	92.6%	92.9%	90.2%	89.5%	89.7%	91.3%	88.4%	88.2%	88.2%	88.3%	88.5%	87.1%	88.4%	88.2%	88.3%	87.4%	84.8%	85.0%	88.5%	
AH429432.1	71.2%	70.9%	71.1%	71.1%	71.2%	71.6%	70.8%	91.8%	91.8%	92.4%	90.2%	94.3%	94.2%	93.3%	90.2%	90.1%	90.0%	90.2%	90.4%	89.1%	90.4%	90.6%	90.4%	90.4%	89.1%	89.9%	88.3%	88.9%
AF013291.1	70.5%	70.4%	70.6%	70.6%	70.7%	70.9%	70.0%	91.2%	91.3%	91.5%	89.5%	94.3%	92.4%	92.2%	89.2%	88.9%	89.0%	89.2%	89.4%	88.0%	89.2%	89.5%	89.2%	89.0%	88.0%	85.2%	86.0%	67.9%
D49496.1	71.5%	71.3%	71.5%	71.4%	71.8%	72.0%	71.1%	91.2%	91.3%	91.1%	89.7%	94.2%	92.4%	92.6%	89.6%	89.7%	89.9%	90.1%	90.0%	88.7%	90.0%	89.7%	89.7%	90.0%	89.4%	87.1%	87.3%	68.9%
KP033526.1	71.6%	71.5%	71.6%	71.5%	71.9%	71.0%	92.4%	92.3%	92.6%	91.3%	93.3%	92.2%	92.6%	89.2%	89.2%	89.4%	89.6%	89.5%	89.5%	88.4%	89.6%	89.5%	89.4%	88.1%	85.6%	86.6%	89.3%	
D16405.1	71.7%	71.5%	71.5%	71.2%	71.7%	72.0%	71.3%	90.1%	90.6%	90.1%	88.4%	90.2%	89.2%	89.6%	89.2%	88.5%	97.6%	97.9%	97.2%	95.0%	96.5%	96.4%	90.8%	89.4%	86.4%	86.7%	89.7%	
D12499.1	71.7%	71.4%	71.5%	71.1%	71.5%	71.9%	71.3%	90.4%	90.8%	90.4%	88.2%	90.1%	88.9%	89.7%	89.2%	88.5%	97.6%	97.8%	97.3%	95.5%	96.8%	96.8%	90.6%	89.1%	86.1%	86.3%	88.9%	
NC_001440.1	71.8%	71.5%	71.4%	71.2%	71.6%	72.0%	71.3%	90.2%	90.7%	90.3%	88.2%	90.0%	89.0%	89.9%	89.4%	97.6%	97.6%	97.6%	99.5%	96.7%	95.3%	96.7%	96.7%	91.0%	89.7%	86.4%	86.6%	69.0%
A517802.1	71.8%	71.6%	71.5%	71.2%	71.7%	72.0%	71.3%	90.4%	90.9%	90.5%	88.3%	90.2%	89.2%	90.1%	89.6%	97.5%	97.8%	97.8%	97.0%	95.3%	96.8%	96.8%	91.3%	89.6%	86.0%	86.5%	89.2%	
AB004781.1	71.7%	71.5%	71.4%	71.2%	71.7%	71.9%	71.2%	90.2%	90.9%	90.1%	89.5%	90.4%	89.4%	90.0%	89.5%	97.2%	97.3%	97.3%	97.0%	94.6%	90.1%	96.4%	90.1%	89.4%	85.5%	86.5%	68.4%	
L36251.1	71.3%	71.0%	71.2%	70.9%	71.3%	71.7%	70.9%	89.7%	89.2%	89.0%	87.1%	89.1%	89.0%	88.7%	88.4%	95.0%	95.3%	95.3%	94.6%	97.3%	96.2%	89.6%	89.2%	85.3%	85.5%	67.6%		
KR555607.1	72.1%	71.8%	71.8%	71.6%	71.9%	72.4%	71.5%	89.8%	90.3%	90.3%	88.4%	90.4%	89.2%	90.0%	89.6%	96.8%	96.7%	96.8%	96.1%	97.3%	98.1%	90.7%	89.7%	86.3%	86.4%	89.2%		
JK014248.1	72.0%	71.9%	71.8%	71.6%	72.0%	72.4%	71.6%	90.3%	90.6%	90.5%	88.2%	90.6%	89.5%	90.0%	89.5%	96.4%	96.8%	96.7%	96.9%	96.4%	96.2%	98.1%	91.3%	89.6%	86.6%	86.6%	69.0%	
KC527749.1	72.0%	71.9%	71.9%	71.8%	72.2%	72.3%	71.6%	90.4%	90.7%	90.2%	88.3%	90.4%	89.2%	89.9%	89.4%	90.6%	90.6%	91.0%	91.3%	91.1%	89.6%	90.7%	91.3%	88.9%	86.0%	86.3%	68.3%	
N400004.1	70.5%	70.5%	70.5%	70.4%	70.8%	70.7%	70.1%	88.5%	88.8%	88.9%	87.4%	89.1%	88.0%	88.4%	88.1%	89.4%	89.1%	89.7%	89.8%	89.5%	88.2%	89.7%	89.6%	88.0%	86.0%	86.4%	67.8%	
EU723569.1	71.1%	70.9%	71.0%	70.7%	71.3%	71.2%	70.5%	89.0%	89.9%	89.9%	84.6%	89.3%	89.2%	81.1%	89.0%	86.4%	83.1%	86.4%	86.5%	85.3%	85.3%	86.3%	86.3%	88.0%	88.0%	85.1%	67.6%	
DO399550.1	71.0%	70.8%	70.9%	70.7%	71.4%	71.2%	70.5%	86.5%	86.6%	86.4%	85.3%	86.3%	86.0%	87.8%	86.8%	86.7%	86.3%	86.5%	86.5%	85.2%	88.4%	86.8%	86.3%	86.4%	85.1%	85.1%	67.7%	
KU558989.1	64.7%	64.5%	64.4%	64.2%	64.5%	64.2%	63.7%	66.8%	68.5%	68.9%	68.5%	66.9%	67.9%	68.9%	69.3%	68.7%	68.9%	69.0%	69.2%	67.6%	69.2%	69.0%	68.3%	67.9%	67.6%	67.7%		

<그림 1-63> Homology distance of CMV isolates.



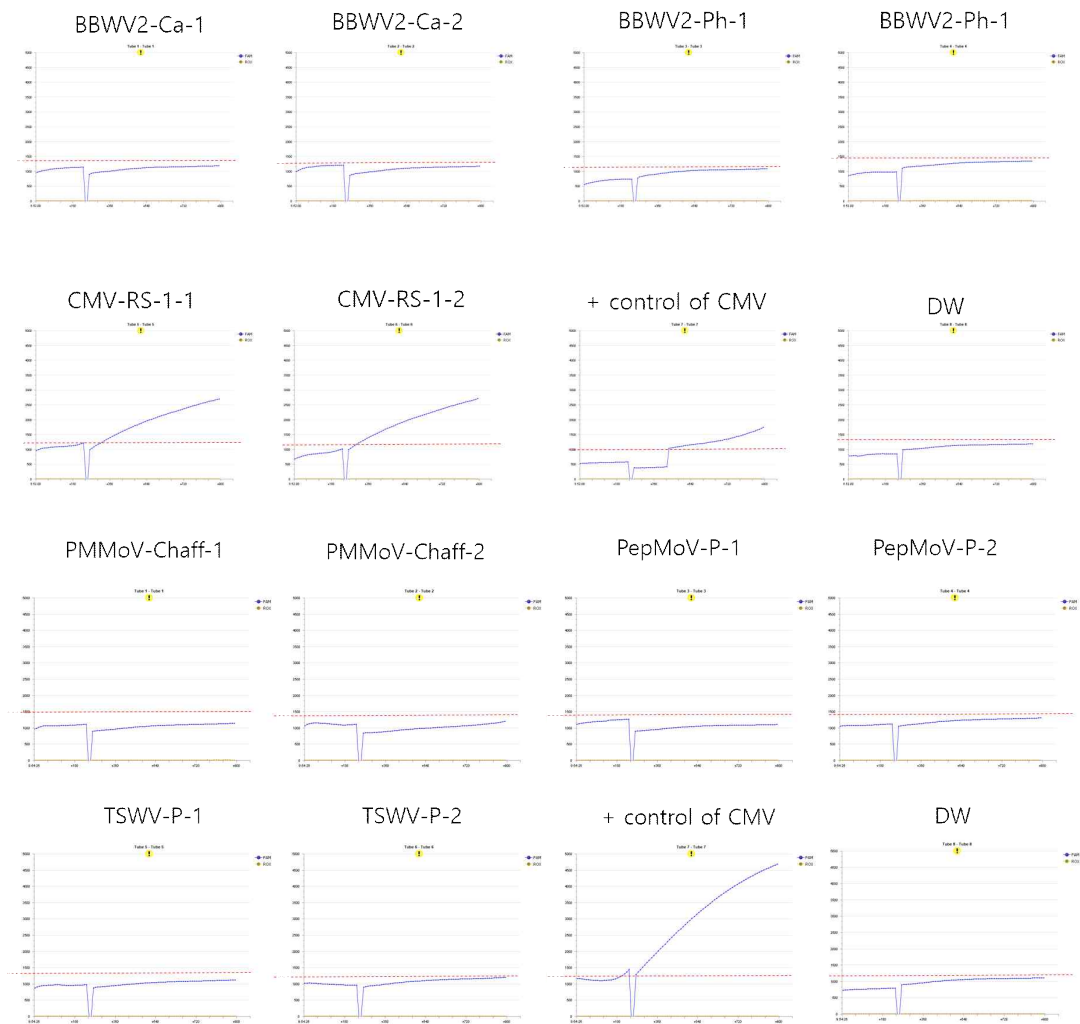
<그림 1-64> Phylogenetic tree of CMV isolates.



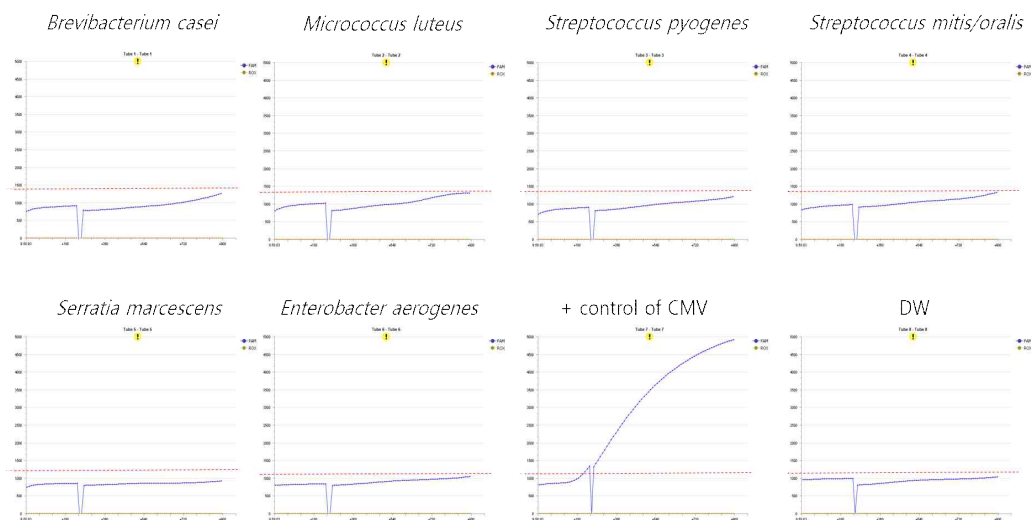
<그림 1-65> Candidate of primer probe sets of CMV isolates.

1. CMV-1,589 F:
5'-TCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTACCTGATTC-3'
2. CMV-1,627 P :
5'-TGA TTC AGT CAC GGA ATA TGA TAA GAA GCT [FAM-dT] G [THF] T [BHQ1-dT] CGC
GCA TTC AAA TTC- [3'-block]
3. CMV-1697R:
5'- TAGAATCAAATTTCCGGCAAAGGATTA ACTCGAATT-3'

<그림 1-66> RPA exo primer & probe set of CMV isolates.

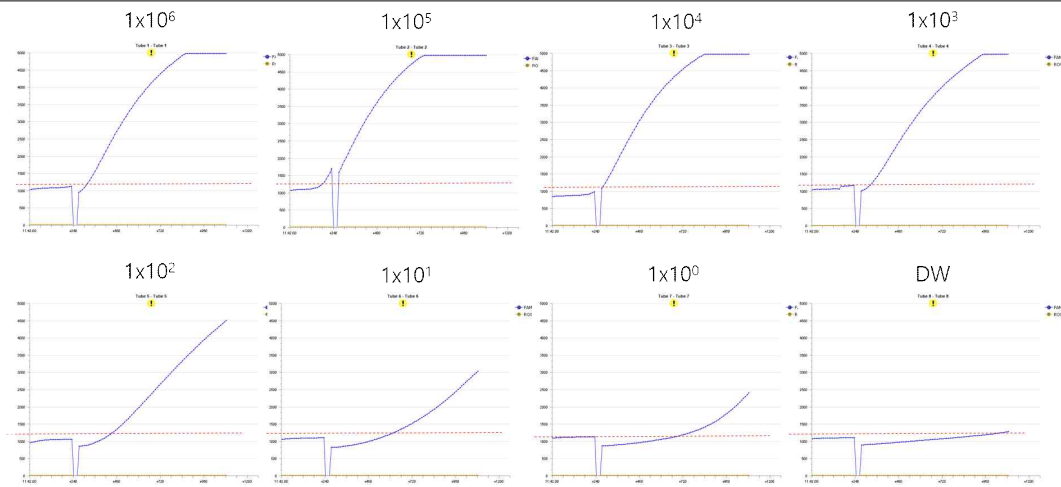


<그림 1-67> RT-RPA reaction with exo primer & probe set of CMV isolates.





<그림 1-68> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of CMV with several bacteria.



<그림 1-69> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of CMV.

- CMV isolates 28건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 4개의 그룹으로 나뉘었다 (그림 1-63, 64).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3 ' 쪽으로 한그룹의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; CMV-1589F, CMV-1627P, CMV-1697R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-65, 66).
- RPA Exo kit를 사용하여 5가지의 고추관련 바이러스들 (CMV, BBWV, PMMoV, PepMoV, TWSV) 과 교차반응을 조사한 결과, CMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-67).
- Exo RT RPA 반응은 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-67).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 CMV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-68).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 20분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-69).
- 이상의 결과로 RT-RPA CMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-70, 71).



<그림 1-70> CMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-CMV-ER-50

Cucumber Mosaic Virus (CMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-CMV-ER-0001
Issue Date: Aug 13, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@naver.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Cucumber Mosaic Virus (CMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of segment RNA3 gene to detect the CMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Cucumber mosaic virus (CMV) is a plant pathogenic virus in the family Bromoviridae. This virus has a worldwide distribution and a very wide host range. In fact it has the reputation of having the widest host range of any known plant virus. It can be transmitted from plant to plant both mechanically by sap and by aphids in a stylet-borne fashion. It can also be transmitted in seeds and by the parasitic weeds, *Cuscuta* sp. (dodder). This virus was first characterized in cucumbers (*Cucumis sativus*) showing mosaic symptoms in 1934, hence the name Cucumber mosaic. Since then, it has been found to infect a great variety of other plants. These include other vegetables such as squash, melons, peppers, tomatoes, beans, carrots, celery, lettuce, spinach, beets, many ornamentals and bedding plants, such as *Narcissus*, and various weeds. Its presence has been confirmed on every continent of the world, including Antarctica. CMV is non-persistently non-circulatively transmitted by more than 80 different aphid species, among other vectors. As consequences, the virus is easily spread, and can be found worldwide. CMV infects over 1200 plant species, including important crops and ornamental species. In its plant host, CMV can induce severe damage, which often lead to economical losses, as it has been proven to cause to 10-20% loss of field yield. CMV is a linear positive-sense, tripartite single-stranded RNA virus. Its genome size is 8.623 kb and it is divided among RNA1 (3357 bp), RNA2 (3050 bp), and RNA3 (2216 bp), all of which has a tRNA-like structure. These three RNAs encode five proteins, proteins 1a, 2a, 2b, movement protein (MP) and coat protein (CP). While proteins 1a and 2a are responsible for the replication of the virus, protein 2b is the host-silencing suppressor. The RNA is surrounded by a protein coat consisting of 32 copies of a single structural protein which form isometric particles.

The Cucumber Mosaic Virus (CMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Cucumber Mosaic Virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the segment RNA3 gene for the unique amplification of the Cucumber Mosaic Virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	CMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	CMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	CMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	CMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	CMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	CMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	CMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

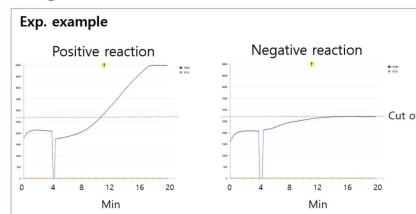
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40 °C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of CMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	Seg RNA3	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	CMV Positive
2	+	-	-	CMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER GO FURTHER

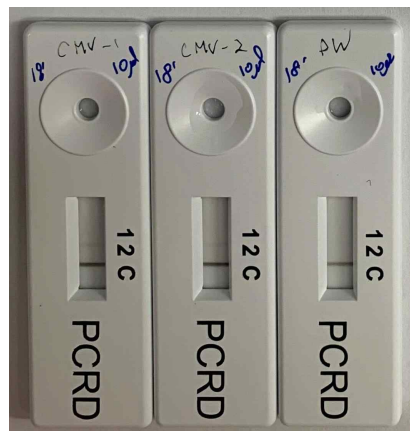
<그림 1-71> Insert of CMV ER Detection kit.

■ CMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. CMVnfo-1,589 F:
5'-TCTTATTATGGTAAAAGGTTGTTATTACCTGATTC-3'
2. CMVnfo-1,627 P :
5'- [FAM] TGA TTC AGT CAC GGA ATA TGA TAA GAA GCT G [THF] TT CGC
GCA TTC AAA TTC- [3'-block]
- 2". CMVnfo2-1,627 P
5'- [FAM] TGA TTC AGT CAC GGA ATA TGA TAA GAA GCT [FAM-dT] G [THF] TT CGC
GCA TTC AAA TTC- [3'-block]
- 2". CMVnfo3-1,627 P
5'- [FAM] TGA TTC AGT CAC GGA ATA TGA TAA GAA GCT G-dSpacer-TT CGC
GCA TTC AAA TTC- Spacer C3-3'
3. CMVnfo-1697R:
5'- [Biotin]TAGAATCAAATTCGGCAAAGGATTAAGTCTCGAATT-3'

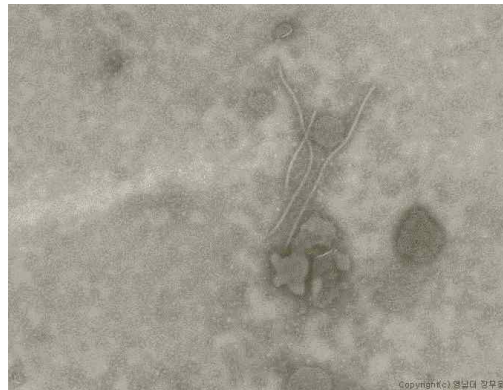
<그림 1-72> RT-RPA nfo primer probe set of CMV.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT CMV primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-72).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39℃에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 여러개의 프로브 후보중에 단 하나만이 미약하게나마 CMV를 검출할 수 있었던 것이 CMVnfo3-1,627 probe였다 (그림 1-73).
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.



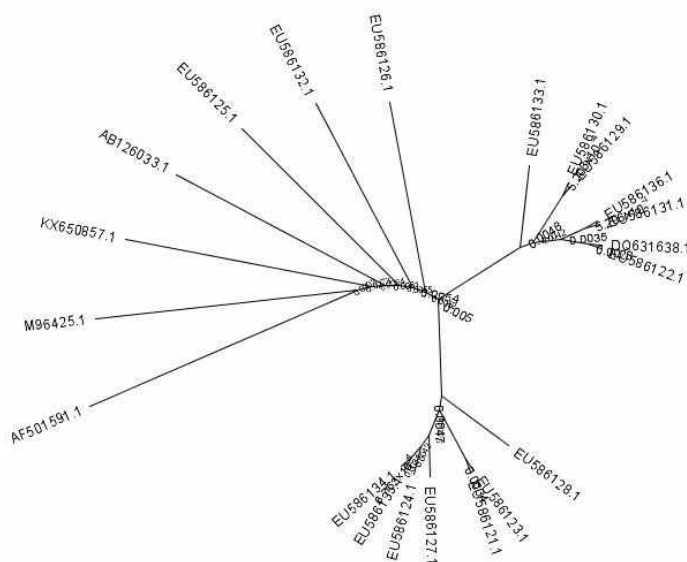
<그림 1-73> RT-RPA nfo reaction with CMVnfo3-1,627p probe set of CMV.

5. Peper mottle virus (PepMoV) - RPA probe 진단제 개발

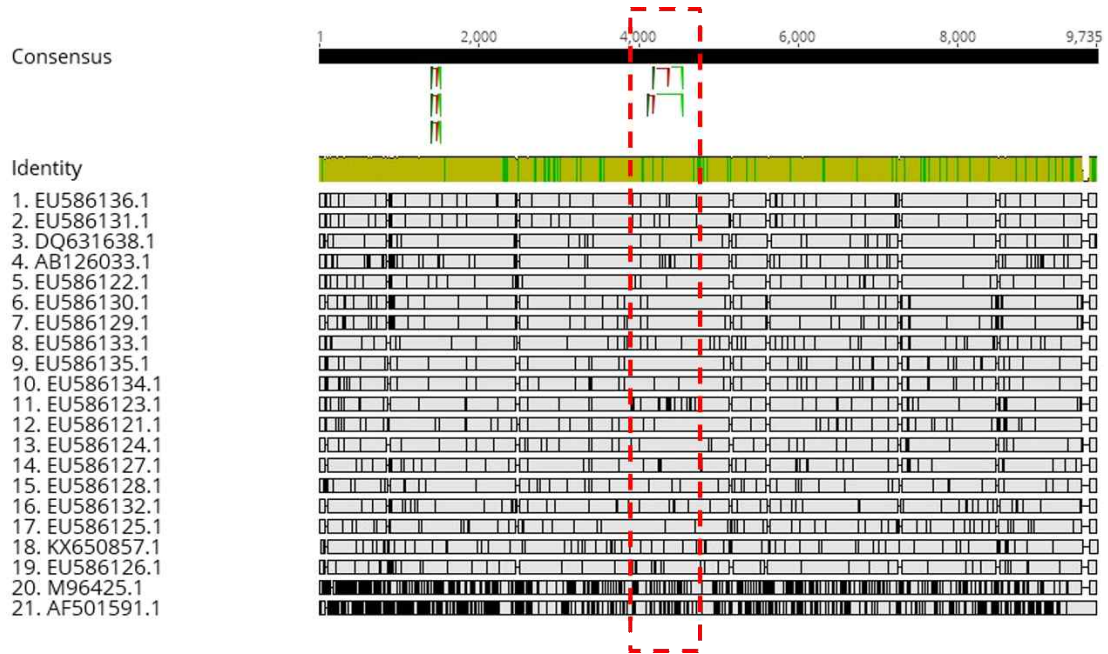


EU586...	EU586...	DQ631...	AB126...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	EU586...	KX650...	EU586...	M9642...	AF501...
EU586136.1	99.9%	99.3%	98.9%	99.4%	99.2%	99.1%	99.0%	99.1%	99.0%	99.0%	99.1%	99.0%	99.1%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%	99.0%
EU586131.1	99.9%	99.3%	98.9%	99.3%	99.1%	99.0%	98.9%	99.0%	99.0%	98.9%	99.0%	99.1%	98.9%	99.0%	98.9%	98.7%	99.0%	94.7%	93.6%
DQ631638.1	99.3%	99.3%	99.3%	99.4%	99.2%	99.1%	99.0%	99.1%	99.0%	99.0%	99.1%	99.2%	99.0%	99.0%	99.0%	98.8%	99.1%	94.8%	93.6%
AB126033.1	98.9%	98.9%	99.3%	99.0%	98.8%	98.7%	98.7%	98.7%	98.7%	98.6%	98.7%	98.6%	98.6%	98.6%	98.6%	98.4%	98.7%	94.7%	93.4%
EU586122.1	99.4%	99.3%	99.4%	99.0%	99.3%	99.2%	99.1%	99.2%	99.1%	99.0%	99.1%	99.2%	99.1%	99.2%	99.1%	99.1%	98.9%	99.1%	94.9%
EU586130.1	99.2%	99.1%	99.2%	98.8%	99.3%	99.2%	99.1%	99.2%	99.0%	98.9%	99.0%	99.1%	99.0%	99.0%	98.9%	98.9%	98.7%	99.0%	94.8%
EU586129.1	99.1%	99.0%	99.1%	98.7%	99.2%	99.0%	99.1%	99.0%	98.9%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.8%	98.7%	98.9%	94.7%
EU586133.1	99.0%	98.9%	99.0%	98.7%	99.1%	99.2%	99.1%	99.0%	98.9%	98.8%	98.9%	99.0%	98.9%	98.9%	98.9%	98.8%	98.6%	98.8%	94.6%
EU586135.1	99.1%	99.0%	99.1%	98.7%	99.2%	99.1%	99.0%	99.0%	98.9%	98.8%	98.9%	99.0%	98.9%	98.9%	98.9%	98.8%	98.7%	99.0%	94.8%
EU586134.1	99.0%	99.0%	99.1%	98.7%	99.1%	99.0%	98.9%	98.9%	99.0%	98.9%	99.0%	99.1%	99.0%	99.0%	98.9%	98.9%	98.7%	98.9%	94.7%
EU586123.1	99.0%	98.9%	99.0%	98.6%	99.0%	98.9%	98.8%	98.8%	99.1%	99.0%	99.2%	99.0%	98.9%	98.8%	98.7%	98.6%	98.8%	94.6%	93.4%
EU586121.1	99.0%	99.0%	99.1%	98.7%	99.1%	99.0%	98.9%	98.9%	99.2%	99.1%	99.3%	99.3%	99.1%	99.0%	98.8%	98.6%	98.7%	98.9%	94.7%
EU586124.1	99.1%	99.1%	99.2%	98.8%	99.2%	99.1%	99.0%	99.4%	99.3%	99.2%	99.3%	99.2%	99.2%	99.0%	99.0%	98.8%	99.0%	94.8%	93.6%
EU586127.1	99.0%	98.9%	99.0%	98.6%	99.1%	99.0%	98.9%	99.2%	99.1%	99.0%	99.1%	99.2%	99.0%	99.0%	98.8%	98.6%	98.9%	94.6%	93.4%
EU586128.1	99.1%	99.0%	99.2%	98.8%	99.2%	99.0%	98.9%	98.9%	99.1%	99.1%	98.9%	99.0%	99.2%	99.0%	98.9%	98.9%	98.7%	99.0%	94.7%
EU586132.1	99.0%	98.9%	99.0%	98.6%	99.1%	98.9%	98.9%	99.0%	98.9%	98.8%	98.8%	99.0%	98.9%	99.0%	98.9%	98.6%	98.8%	98.8%	94.7%
EU586125.1	99.0%	98.9%	99.0%	98.6%	99.1%	98.9%	98.8%	98.8%	99.0%	98.9%	98.7%	98.8%	99.0%	98.8%	98.9%	98.9%	98.6%	98.9%	94.6%
KX650857.1	98.8%	98.7%	98.8%	98.4%	98.9%	98.7%	98.7%	98.6%	98.8%	98.7%	98.6%	98.7%	98.6%	98.7%	98.6%	98.6%	98.6%	98.7%	94.5%
EU586126.1	99.0%	99.0%	99.1%	98.7%	99.1%	99.0%	98.9%	98.8%	99.0%	98.9%	98.6%	98.9%	99.0%	98.8%	99.0%	98.6%	98.9%	98.7%	94.7%
M96425.1	94.7%	94.7%	94.8%	94.7%	94.9%	94.8%	94.7%	94.6%	94.8%	94.7%	94.6%	94.7%	94.6%	94.6%	94.7%	94.6%	94.5%	94.7%	93.9%
AF501591.1	93.6%	93.5%	93.6%	93.4%	93.7%	93.6%	93.4%	93.6%	93.5%	93.4%	93.5%	93.6%	93.4%	93.6%	93.4%	93.4%	93.3%	93.5%	93.9%

<그림 1-74> Homology distance of 21 PepMoV isolates.



<그림 1-75> Phylogenetic tree of 21 PepMoV isolates.



<그림 1-76> Region of RPA exo primers and probes of 21 PepMoV isolates.

1. PepMoV-4197 F:

5'-ATTTAGAAGCTTAATTCATACATACCACACTAATT-3'

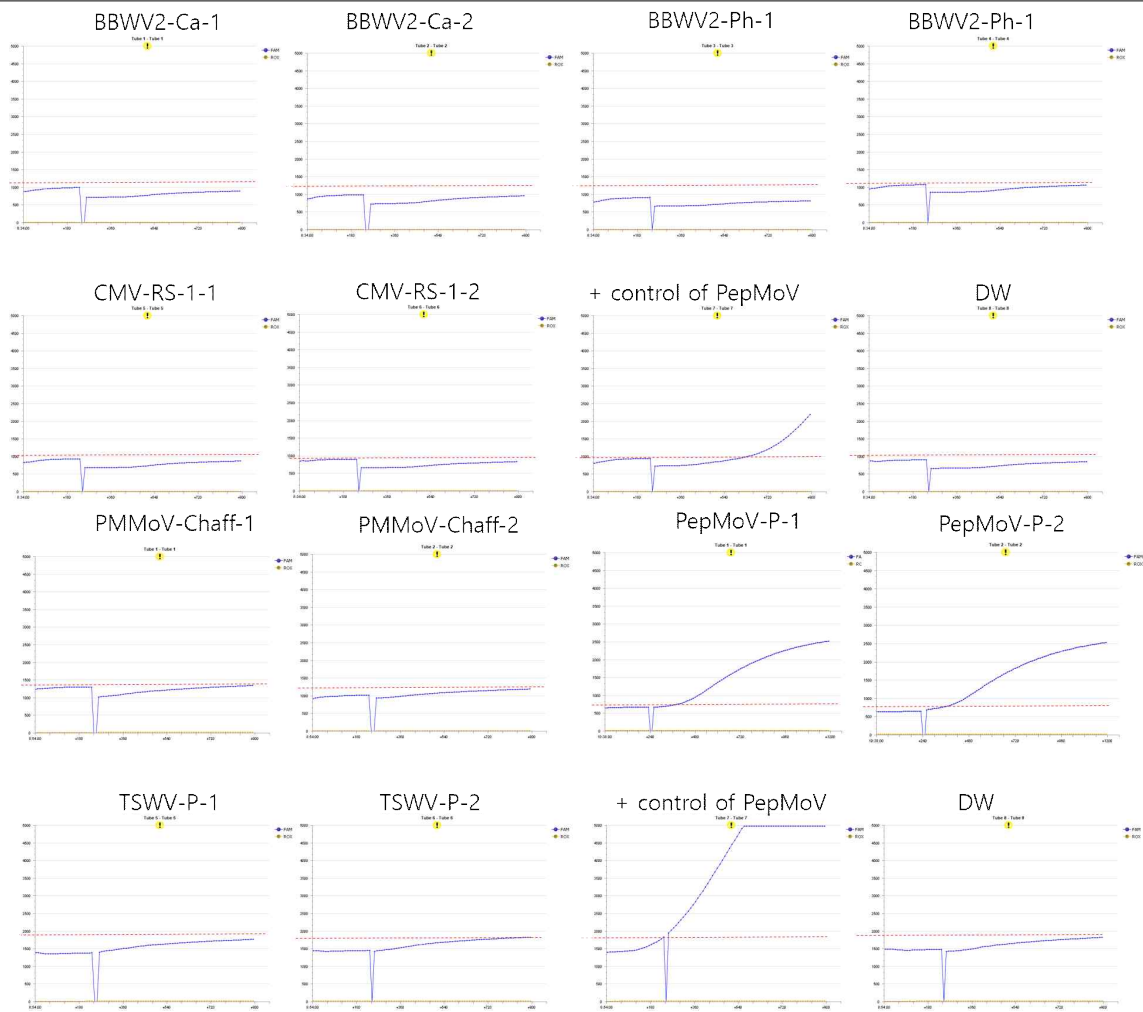
2. PepMoV-4,379 P :

5'- ACA TGA TCC AAT ACG GAA ATA ACT TAT TAG [FAM-dT] G [THF] A [BHQ1-dT] GTA GCT
AGT TAT AAT -[3'-block]

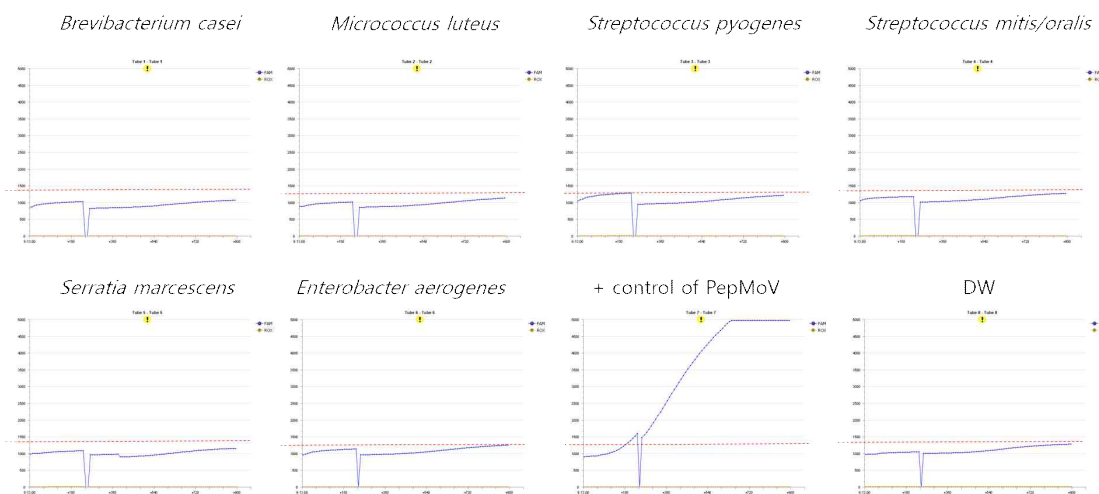
3. PepMoV-4,594 R:

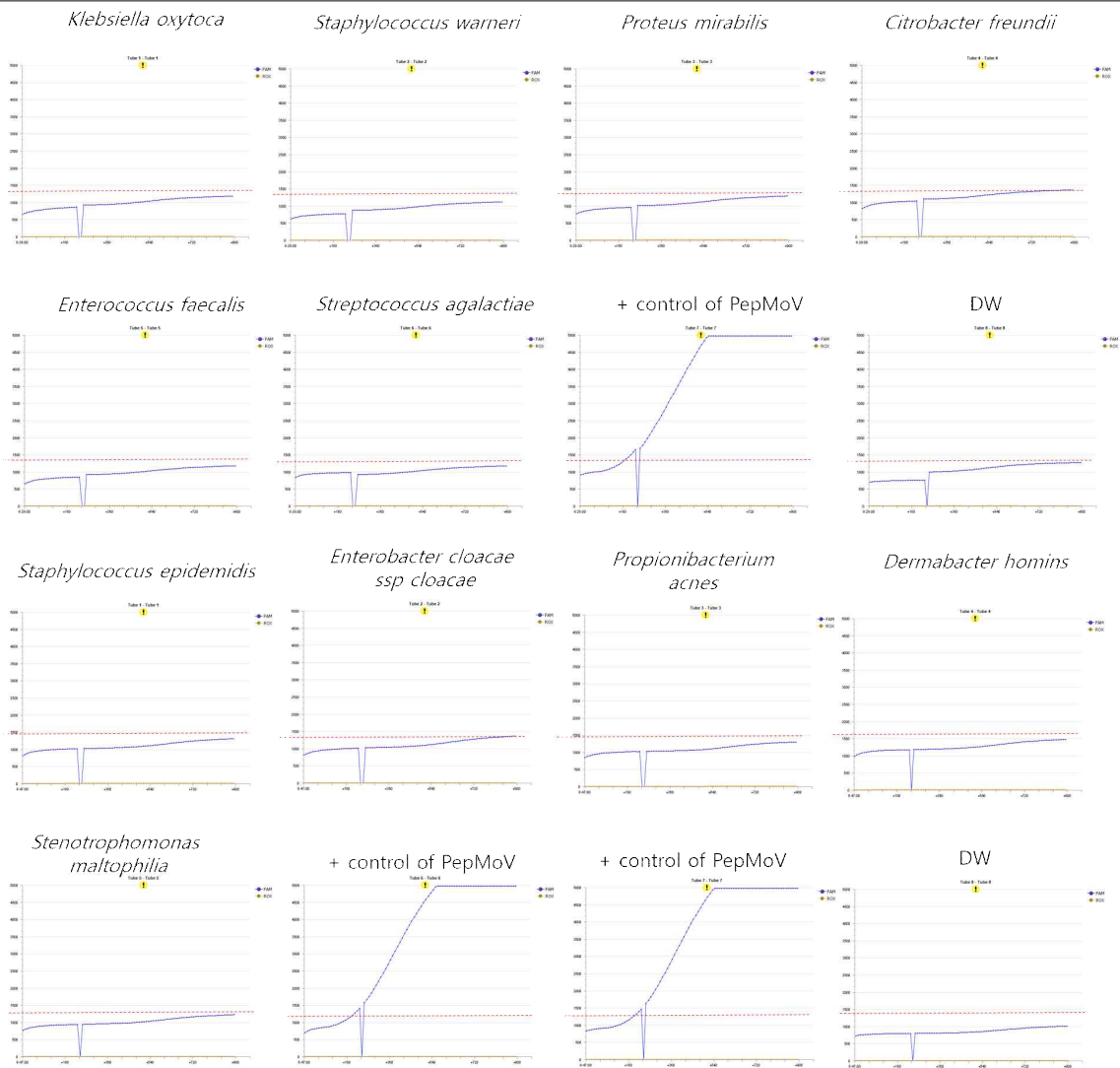
5'- AACATCTATATCCAAAGTTACTCCATTTTCAATAA -3'

<그림 1-77> RPA exo primer and probe of 21 PepMoV isolates.



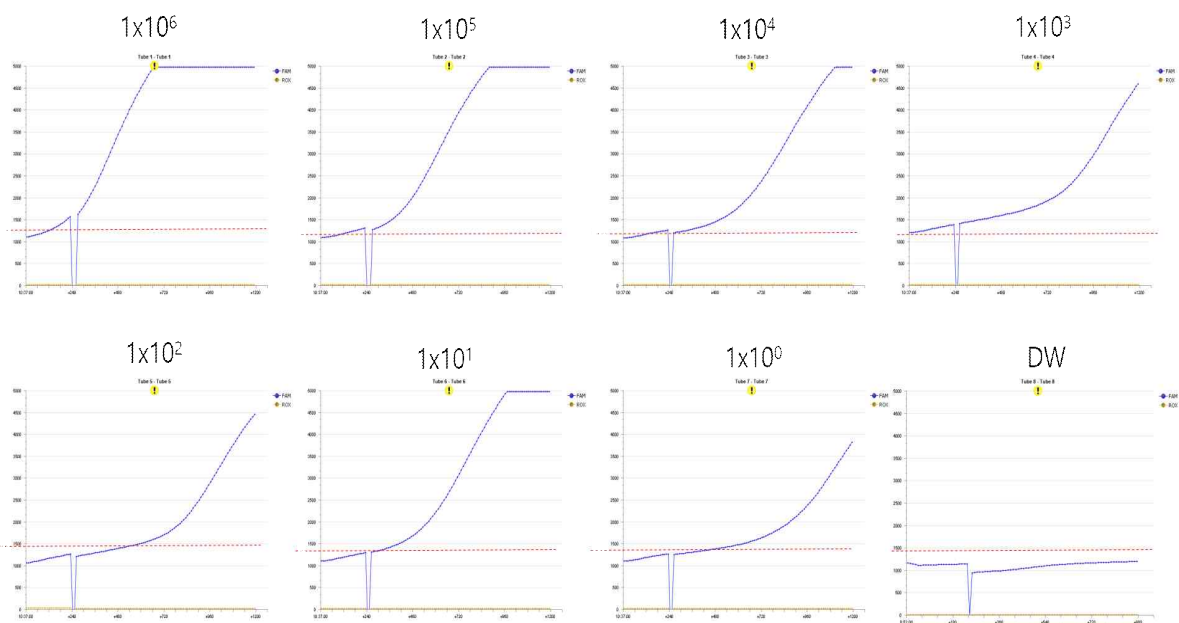
<그림 1-78> RT-RPA exo reaction with PepMoV primer and probe set.





<그림 1-79> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of PepMoV with several bacteria.

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	PepMoV - mRNA transcript	Positive



<그림 1-80> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of PepMoV.



<그림 1-81> PePMoV ER detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-PepMoV-ER-50

Pepper Mottle Virus (PepMoV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-PepMoV-ER-0001
Issue Date: Aug 13, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Backto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@naver.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Pepper Mottle Virus (PepMoV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of polyprotein precursor gene to detect the PepMoV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Pepper mottle virus (PepMoV) is a plant pathogenic virus in the genus Potyvirus and the virus family Potyviridae. Like other members of the Potyvirus genus, PepMoV is a monopartite strand of positive-sense, single-stranded RNA surrounded by a capsid made for a single viral encoded protein. The virus is a filamentous particle that measures about 737 nm in length. Isolates of this virus has been completely sequenced and its RNA is 9640 nucleotides long. This virus is transmitted by several species of aphids in a nonpersistent manner and by mechanical inoculation. Pepper mottle was first recognized as a new strain of PVY infecting peppers in Arizona in 1969. In the early 1970s an "atypical" PVY isolate was also found in a survey of pepper fields in central Florida. Up until then, the two most important potyviruses infecting peppers in the US were Tobacco etch virus (TEV) and Potato virus Y (PVY). By 1975 it was clear that a third potyvirus, PepMoV (PeMV), was contributing to crop losses in pepper growing areas of the United States. This virus infects many species of Solanaceae, including several species of Capsicum (i.e. C. annuum, C. frutescens), Datura spp., Lycopersicon esculentum, Physalis floriana, tobacco (Nicotiana spp.) and nightshade (Solanum sp.). It was its reaction on C. frutescens (Tabasco pepper) that alerted researchers to the presence of a new virus in peppers. Symptoms of PepMoV on pepper include dark green vein banding, mottle/mosaic, puckered or crinkled leaves, and misshapen fruit. Plants infected early in the growing season can be stunted and the virus can decrease yield significantly. Surveys have shown that PepMoV can often occur in mixed infections with TEV and/or PVY so a technique such as ELISA must be used to differentiate these three virus in pepper. PepMoV makes two types of inclusions in infected cells, the typical cylindrical inclusions (CI) and an amorphous inclusion (AI). Thus leaf strips stained with the protein stain, OG, and the nucleic acid stain, AA, can be used to identify this virus in pepper. The CI only stains in OG while the AI stains in both stains.

The Pepper Mottle Virus (PepMoV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Pepper Mottle Virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the polyprotein precursor gene for the unique amplification of Pepper Mottle Virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	PepMoV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	PepMoV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	PepMoV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	PepMoV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	PepMoV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	PepMoV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	PepMoV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

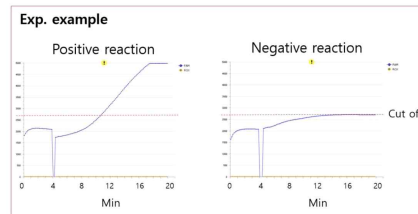
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of PepMoV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	Polyprotein precursor	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	PepMoV Positive
2	+	-	-	PepMoV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-82> Insert of PepMoV ER detection kit.

- PepMoV isolates 21건에 대한 유전자를 분석한 결과, 변이가 다른 바이러스 보다는 작은 것으로 보였다 (그림 1-74, 75).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5 ‘ 쪽과 중간에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; PepMoV-4197F, PepMoV-4379P, PepMoV-4594R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-76, 77).
- RPA Exo kit를 사용하여 5가지의 고추관련 바이러스들 (CMV, BBWV, PMMoV, PepMoV, TWSV)과 교차반응을 조사한 결과, PepMoV에만 잘 반응하였다 (그림 1-78).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-78).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 PepMoV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-79).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-80).
- 이상의 결과로 RT-RPA PepMoV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-81, 82).

■ PepMoV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. PepMoVnfo-4197 F:

5'-ATTTAGAAGCTTAATTCATACATACCACACTAATT-3'

2. PepMoVnfo-4,379 P :

5'- [FAM] ACA TGA TCC AAT ACG GAA ATA ACT TAT TAG G [THF] A T GTA GCT
AGT TAT AAT -[3'-block]

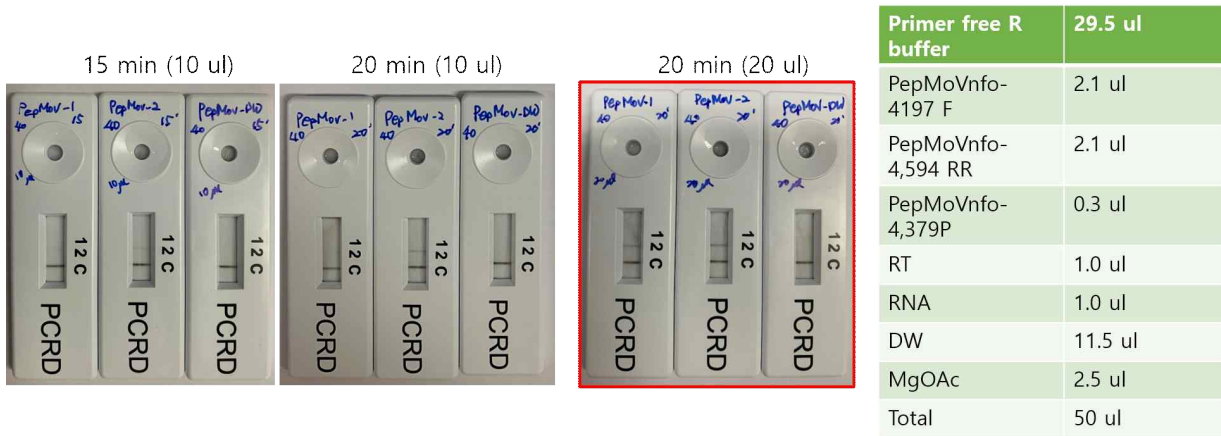
3. PepMoVnfo-4,594 R:

5'- [Biotin] AACATCTATATCCAAAGTTACTCCATTTTCAATAA -3'

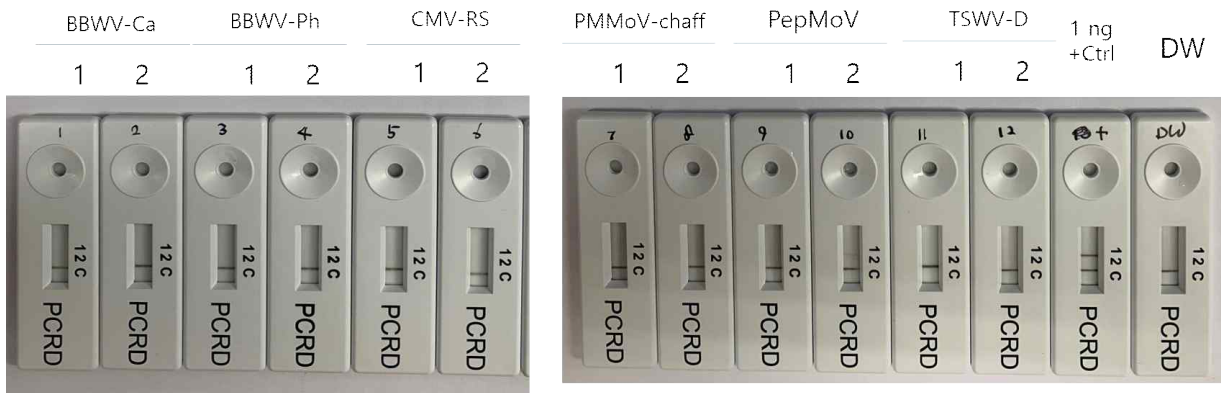
<그림 1-82> RT-RPA nfo primer probe set of PepMoV.

- 엘씨엠씨아연스에서 개발한 Exo RT PepMoV primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-82).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 10 ul 보다는 20 ul nfo 반응액을 PCR에 올렸을 때, 밴드의 색이 더 강하게 나타났다 (그림 1-83).

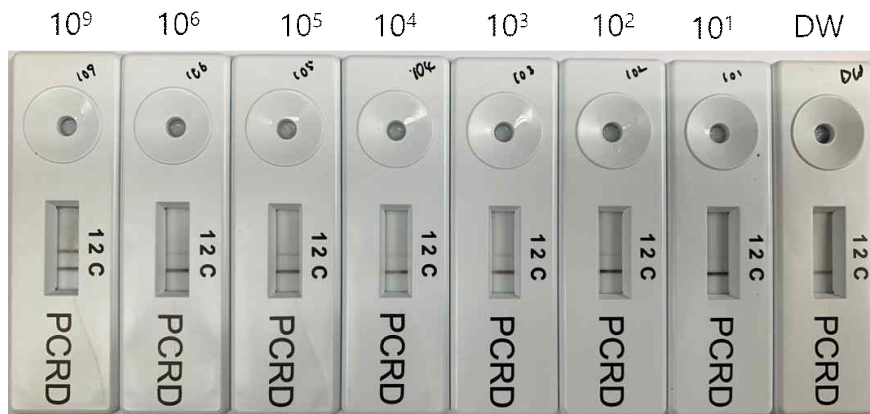
- 5가지의 고추관련바이러스중에서 PepMoV와만 반응을 하였다 (그림 1-84).
- 검출한계는 1 copies/ul 까지 가능하였다 (그림 1-85).



<그림 1-83> RT-RPA nfo primer probe set of PepMoV.



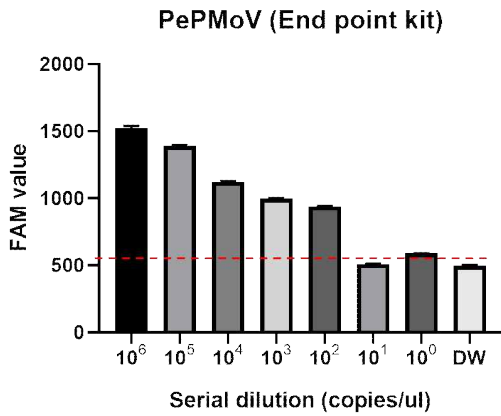
<그림 1-84> RT-RPA nfo reaction with PepMoV primer and probe set.



<그림 1-85> LoD of RT-RPA nfo reaction with PepMoV primer and probe set.

■ PepMoV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과

10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	DW	Reagent	Volume
1523	1388	1118	995	937	510	591	502	2x RB	10 ul
1509	1394	1125	1000	941	508	590	494	100mM dNTP	0.6 ul
								10x E. Mix	2.0 ul
								20x core Mix	1.0 ul
								PepMoVnfo-4197 F	1.0 ul
								PepMoVnfo-4594 R	1.0 ul
								RT	0.5 ul
								MgOAC	1.0 ul
								RNA	1.0 ul
								DW	1.9 ul
								Total	20 ul

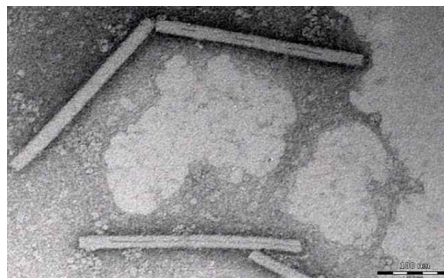


39C, 15 min

<그림 1-86> LoD of RT-RPA end point detection kit.

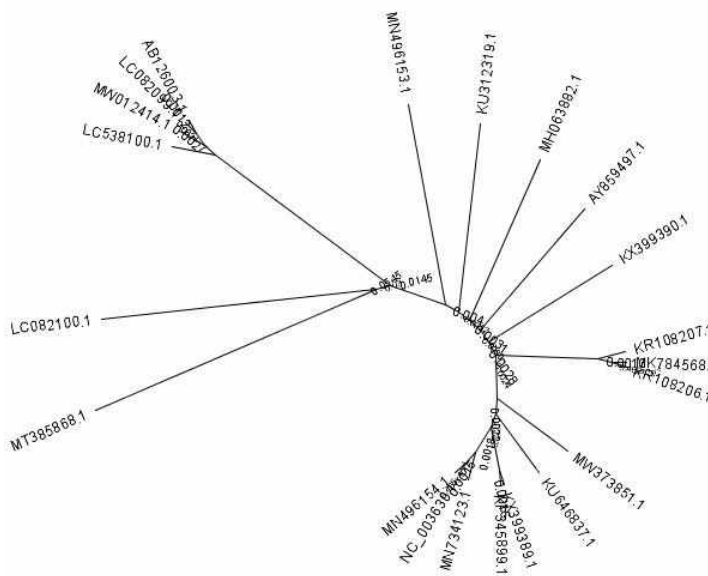
○ 사이버그린을 이용한 PepMoV end point detection kit의 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-86).

6. Peper mild mottle virus (PMMoV) - RPA probe 진단제 개발

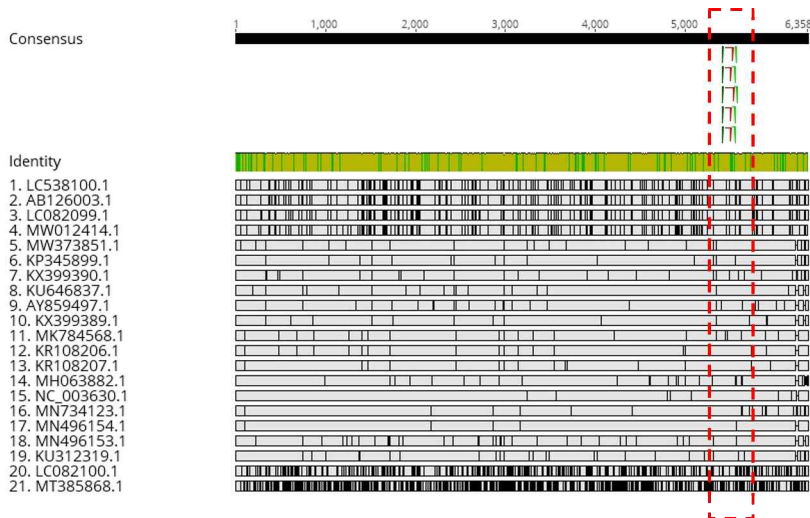


NC_00...	MW37...	MW01...	MT385...	MN734...	MN496...	MN496...	MK784...	MH063...	LC538...	LC082...	LC082...	KX399...	KX399...	KU646...	KU312...	KR108...	KR108...	KP345...	AY859...	AB126...
NC_003630.1	99.6%	97.3%	90.0%	99.6%	99.8%	99.3%	99.5%	99.5%	97.2%	94.4%	97.4%	99.5%	99.7%	99.6%	99.5%	99.7%	99.6%	99.6%	99.5%	97.4%
MW373851.1	99.6%	97.1%	90.1%	99.4%	99.6%	99.2%	99.4%	99.3%	97.0%	94.2%	97.2%	99.5%	99.6%	99.6%	99.4%	99.4%	99.4%	99.7%	99.4%	97.2%
MW012414.1	97.3%	97.1%	90.1%	97.2%	97.3%	96.8%	97.0%	97.1%	99.3%	94.6%	99.6%	97.1%	97.2%	97.1%	97.0%	97.1%	97.1%	97.2%	97.0%	99.5%
MT385868.1	90.0%	90.1%	90.1%	90.0%	90.1%	89.9%	90.0%	89.9%	90.1%	89.9%	90.3%	90.1%	90.1%	90.1%	90.0%	90.0%	90.0%	90.1%	90.0%	90.3%
MN734123.1	99.6%	99.4%	97.2%	99.0%	99.8%	99.2%	99.4%	99.3%	97.1%	94.4%	97.3%	99.3%	99.6%	99.4%	99.4%	99.5%	99.5%	99.5%	99.3%	97.3%
MN496154.1	99.8%	99.6%	97.3%	99.1%	99.8%	99.4%	99.6%	99.5%	97.2%	94.4%	97.5%	99.5%	99.7%	99.6%	99.5%	99.7%	99.7%	99.7%	99.5%	97.4%
MN496153.1	99.3%	99.2%	96.8%	89.9%	99.2%	99.4%	99.1%	99.1%	96.8%	94.1%	97.0%	99.1%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.2%	99.1%	97.0%
MK784568.1	99.5%	99.4%	97.0%	90.0%	99.4%	99.6%	99.1%	99.3%	96.9%	94.1%	97.2%	99.3%	99.4%	99.4%	99.3%	99.7%	99.8%	99.4%	99.3%	97.2%
MH063882.1	99.5%	99.3%	97.1%	89.9%	99.3%	99.5%	99.1%	99.3%	96.9%	94.2%	97.2%	99.2%	99.4%	99.3%	99.2%	99.4%	99.4%	99.4%	99.4%	99.2%
LC538100.1	97.2%	97.0%	99.3%	90.1%	97.1%	97.2%	96.8%	96.9%	96.9%	94.4%	99.5%	96.9%	97.1%	97.0%	96.3%	97.0%	97.0%	97.0%	96.9%	99.7%
LC082100.1	94.4%	94.2%	94.6%	89.9%	94.4%	94.4%	94.1%	94.1%	94.2%	94.4%	94.7%	94.2%	94.4%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.2%	94.1%	94.6%
LC082099.1	97.4%	97.2%	99.6%	90.3%	97.3%	97.5%	97.0%	97.2%	97.2%	99.5%	94.7%	97.2%	97.3%	97.3%	97.2%	97.3%	97.3%	97.3%	97.2%	99.8%
KX399390.1	99.5%	99.5%	97.1%	90.1%	99.3%	99.5%	99.1%	99.3%	99.2%	96.9%	94.2%	97.2%	99.5%	99.5%	99.2%	99.4%	99.3%	99.5%	99.4%	97.2%
KX399389.1	99.7%	99.6%	97.2%	90.1%	99.6%	99.7%	99.2%	99.4%	99.4%	97.1%	94.4%	97.3%	99.5%	99.6%	99.4%	99.5%	99.5%	99.5%	99.7%	99.5%
KU646837.1	99.6%	99.6%	97.1%	90.1%	99.4%	99.6%	99.2%	99.4%	99.3%	97.0%	94.2%	97.3%	99.5%	99.6%	99.3%	99.4%	99.4%	99.6%	99.6%	97.3%
KU312319.1	99.5%	99.4%	97.0%	90.0%	99.4%	99.5%	99.2%	99.3%	99.2%	96.9%	94.2%	97.2%	99.2%	99.4%	99.3%	99.4%	99.4%	99.3%	99.4%	99.2%
KR108207.1	99.7%	99.4%	97.1%	90.0%	99.5%	99.7%	99.2%	99.7%	99.4%	97.0%	94.2%	97.3%	99.4%	99.5%	99.4%	99.4%	99.6%	99.5%	99.3%	97.3%
KR108206.1	99.6%	99.4%	97.1%	90.0%	99.5%	99.7%	99.2%	99.8%	99.4%	97.0%	94.2%	97.3%	99.3%	99.5%	99.4%	99.3%	99.8%	99.5%	99.3%	97.2%
KP345899.1	99.6%	99.7%	97.2%	90.1%	99.5%	99.7%	99.2%	99.4%	99.4%	97.0%	94.2%	97.3%	99.5%	99.7%	99.6%	99.4%	99.5%	99.5%	99.5%	97.3%
AY859497.1	99.5%	99.4%	97.0%	90.0%	99.3%	99.5%	99.1%	99.3%	99.2%	96.9%	94.1%	97.2%	99.4%	99.5%	99.6%	99.2%	99.3%	99.3%	99.5%	97.2%
AB126003.1	97.4%	97.2%	99.5%	90.3%	97.3%	97.4%	97.0%	97.2%	97.2%	99.7%	94.6%	99.6%	97.2%	97.3%	97.3%	97.2%	97.3%	97.3%	97.2%	99.8%

<그림 1-87> Homology distance of 21 cases of PMMoV isolates.



<그림 1-88> Phylogenic tree of 21 cases of PMMoV isolates.



<그림 1-89> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 21 cases of PMMoV isolates.

1. PMMoV- 5,415 F:

5'- TATAAAATTAGGCTTGAGAGAGAAAATTACTAGTG -3'

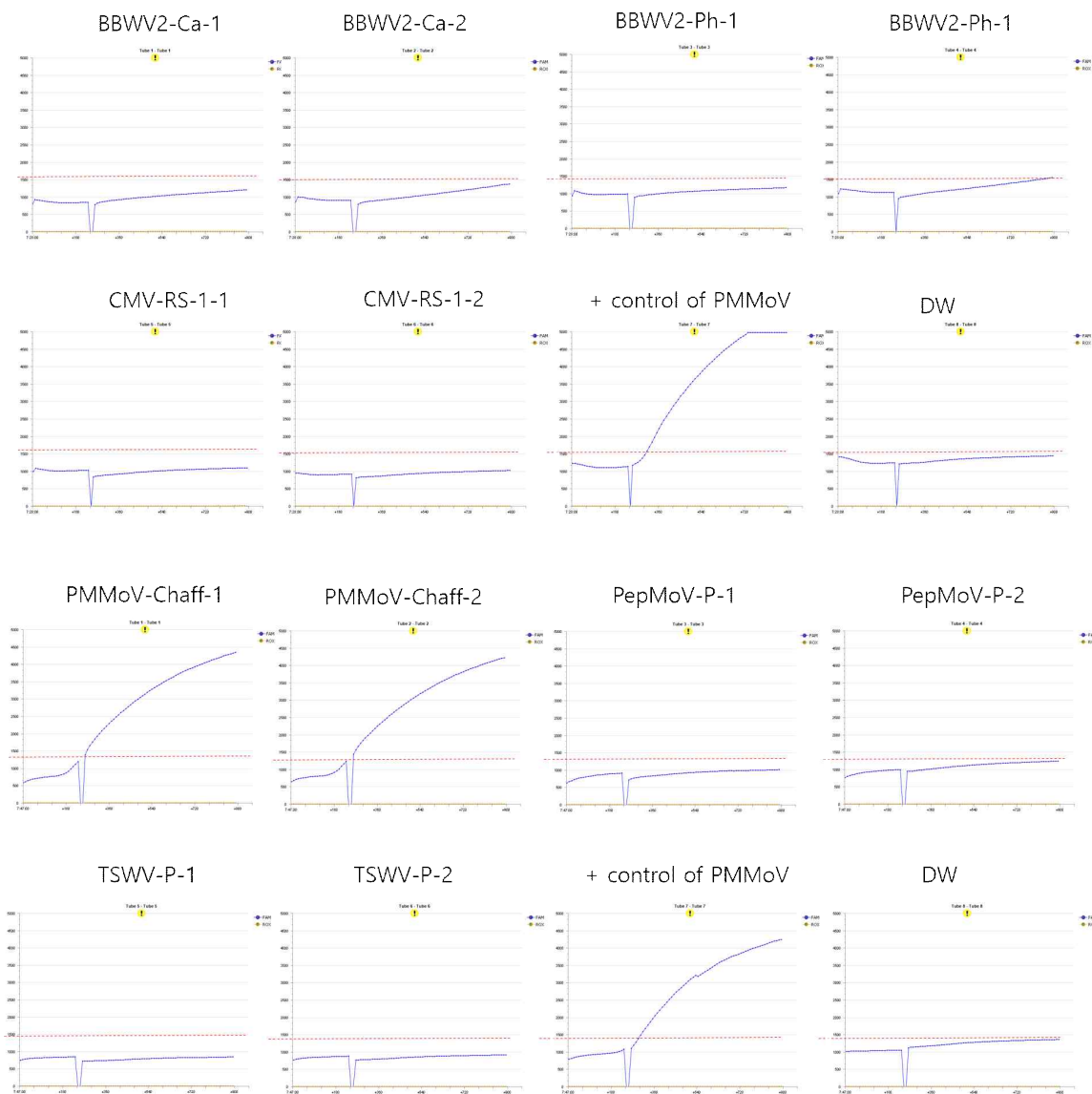
2. PMMoV - 5,504 P:

5'- TCG TTG ATG AGT TCA TCG AAT CAG TTC CAA [FAM-dT] G [THF] C [BHQ1-dT] GAC AGA
TTA CGT AAA TTT -[3'-block]

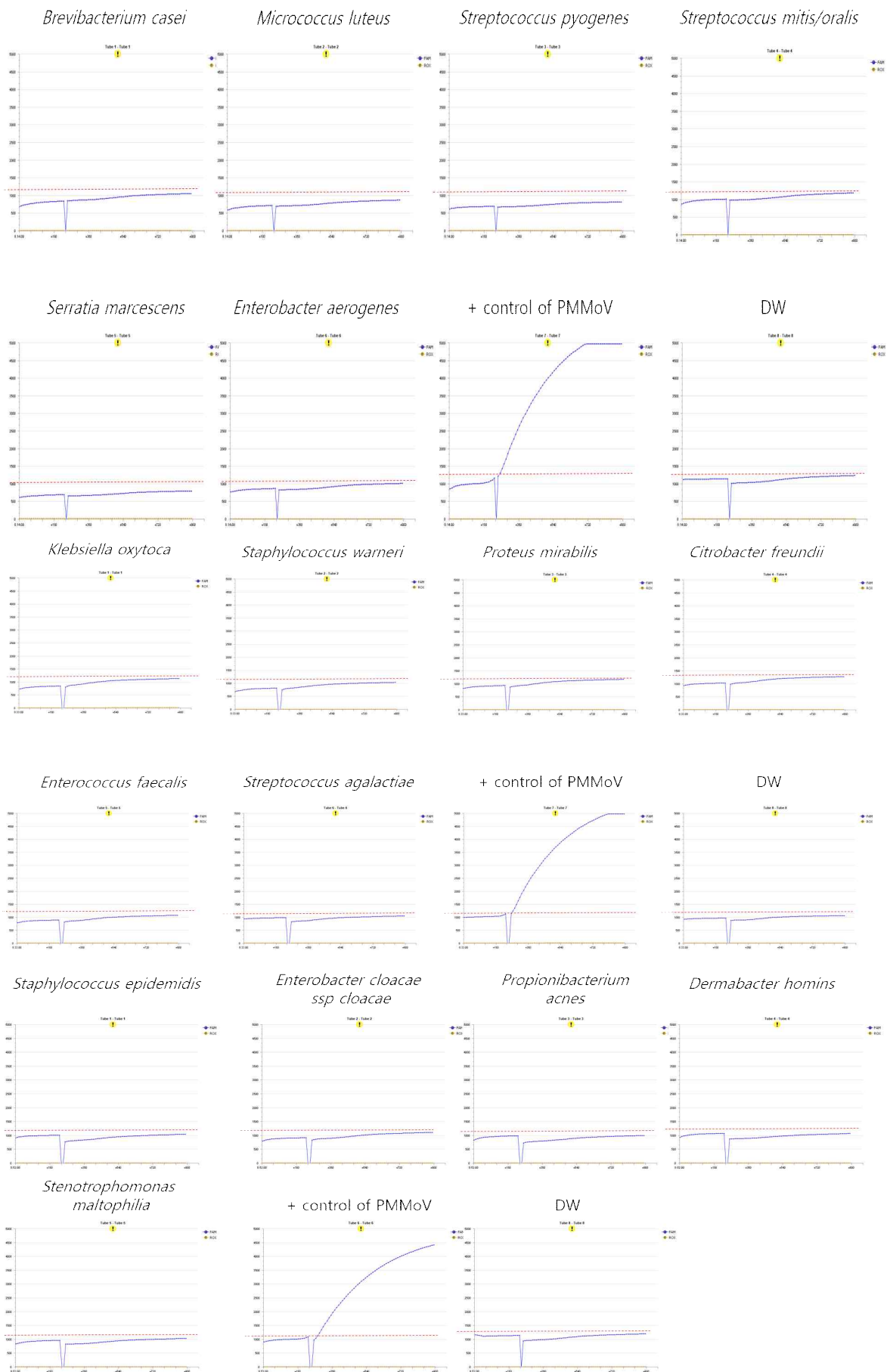
3. PMMoV - 5,584 R:

5'- TTCTCTACCTACATACTTACTTCTTTCTTA -3'

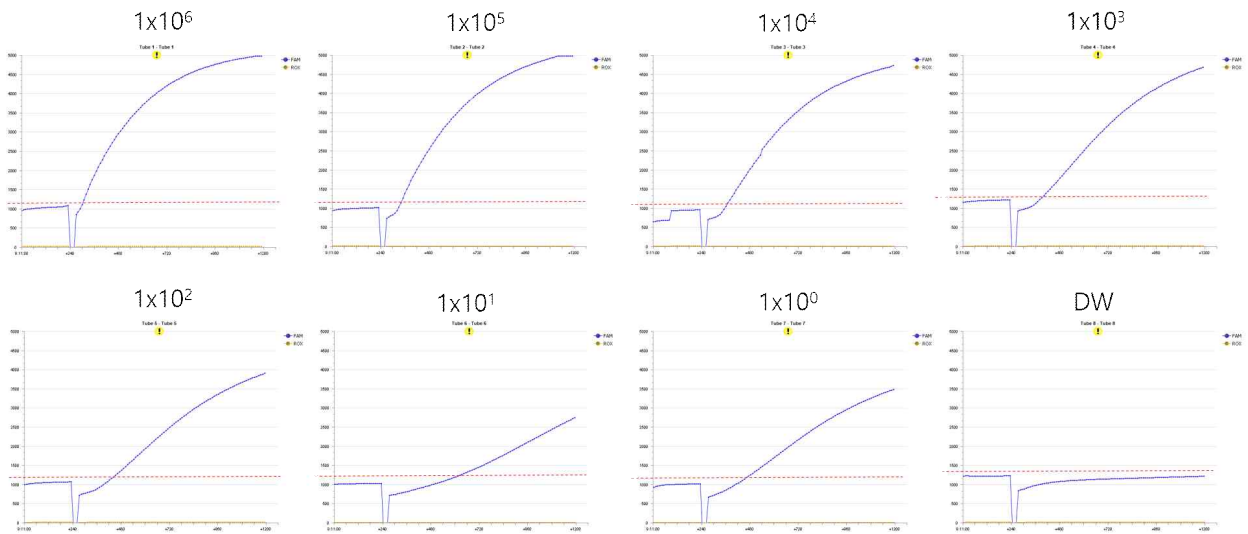
<그림 1-90> RPA exo primer and probe set of 21 cases of PMMoV isolates.



<그림 1-91> RT-RPA exo reaction with PMMoV primer and probe set.



<그림 1-92> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of PMMoV with several bacteria.



<그림 1-93> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of PMMoV.

- PMMoV isolates 21건에 대한 유전자를 분석한 결과, 분리주간 동질성이 90% 이상인 것으로 관찰되어 변이가 다른 바이러스 보다는 작은 것으로 보였다 (그림 1-87, 88).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 3 ‘ 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; PMMoV-5415F, PMMoV-5504P, PMMoV-5584R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-90).
- RPA Exo kit를 사용하여 5가지의 고추관련 바이러스들 (CMV, BBWV, PMMoV, PepMoV, TWSV) 과 교차반응을 조사한 결과, PMMoV에만 잘 반응하였다 (그림 1-91).
- Exo RT RPA 반응은 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-91).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 PMMoV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림1-92).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39℃에서 20분간 반응시킨 결과, 1 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-93).
- 이상의 결과로 RT-RPA PMMoV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-94, 95).



<그림 1-96> PepMoV ER detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-PMMoV-ER-50

Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-PMMoV-ER-0001
Issue Date: Aug 13, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcm-science.co.kr

161-10 Backto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@naver.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of movement protein gene to detect the PMMoV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Pepper mild mottle virus (PMMoV) is a plant pathogenic virus that occurs worldwide on species of field grown bell, hot and ornamental pepper species. It is caused by members of the plant virus genus Tobamovirus- otherwise known as the tobacco mosaic virus family. Tobamovirus are viruses that contain positive sense RNA genomes that infect plants. Symptoms of the disease vary depending on the cultivar. Typical symptoms include the chlorosis of leaves, stunting, and distorted and lumpy fruiting structures. The virus is spread by mechanical transmission and infected seeds. Avoidance is the best means of controlling the disease because once a plant is infected it cannot be treated. Only seeds that have been tested and treated for the pathogen should be planted. Pepper mild mottle virus is the major viral pathogen of peppers (*Capsicum* spp.). The host range of PMMoV include most cultivars and species of pepper (*Capsicum* spp.). This virus strain does not infect tomato, eggplant, or tobacco; however, other members of the genus Tobamovirus can infect these other hosts. PMMoV is one of at least 4 different species of Tobamovirus that infect peppers. The others include Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV) and Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV). Symptoms caused by this pathogen vary based on the specific host cultivar; however, a majority of the symptoms are very similar between the different hosts. Symptoms usually include various degrees of mottling, chlorosis, curling, dwarfing, and distortion of the fruit, leaves, and even whole plants. The symptoms on fruit include: a reduction in size, mottling and color changes, and an obvious distorted and lumpy appearance. Also, many times brown necrotic streaks or splotches can be seen on the leaves and fruit. The symptoms can easily be seen on new growth, and they are far more pronounced if the plant was infected when it was young rather than when it was older. This disease is harmful because of the mild foliar symptoms (chlorosis, necrosis, etc.) and due to this many times the pathogen goes unnoticed until the more evident symptoms on the fruit appear. The Paper Mild Mottle Virus (PMMoV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Paper Mild Mottle Virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the movement protein gene for the unique amplification of Paper Mild Mottle Virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	PMMoV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	PMMoV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	PMMoV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	PMMoV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	PMMoV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	PMMoV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	PMMoV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

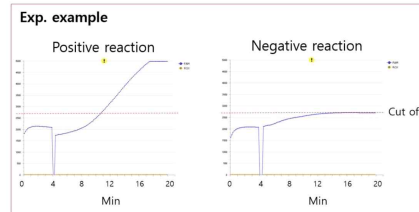
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of PMMoV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	Movement protein gene	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	PMMoV Positive
2	+	-	-	PMMoV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

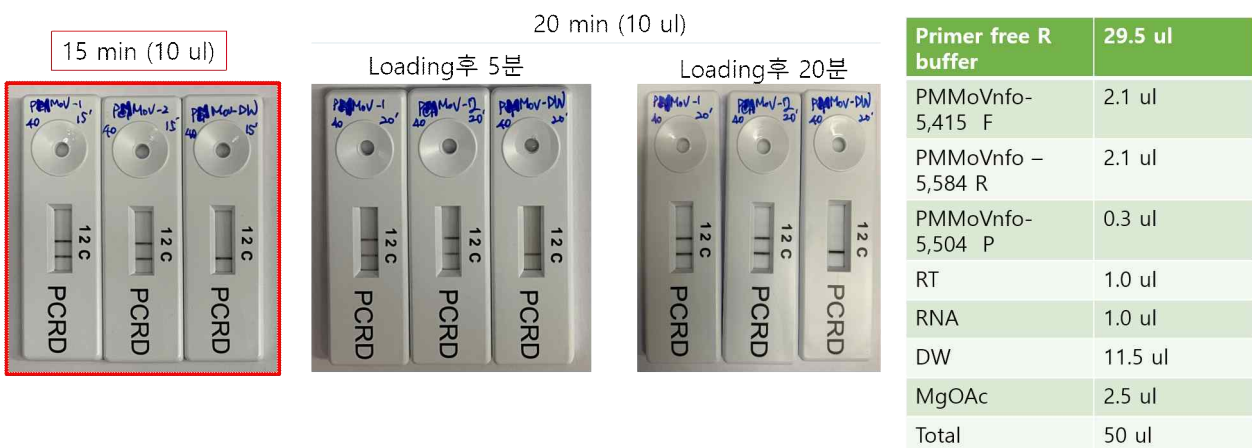
<그림 1-97> Insert of PMMoV ER detection kit.

■ PMMoV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

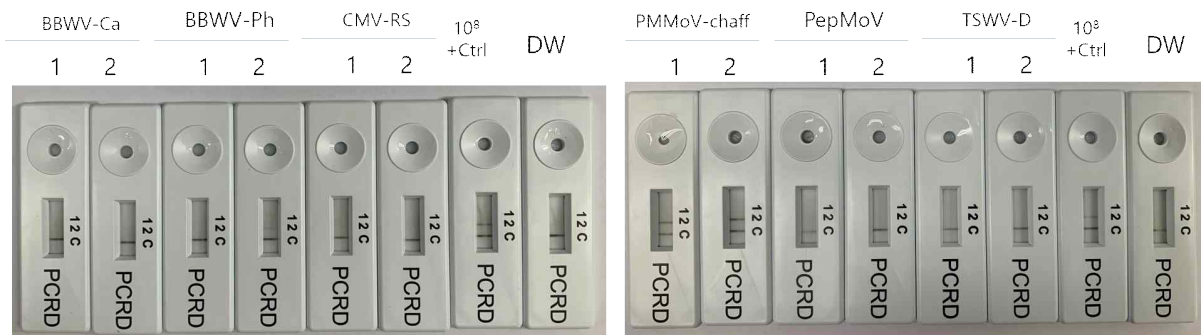
1. PMMoVnfo- 5,415 F :
5'- TATAAAATTAGGCTTGAGAGAGAAAATTACTAGTG -3'
2. PMMoVnfo- 5,504 P :
5'- [FAM] TCG TTG ATG AGT TCA TCG AAT CAG TTC CAA [FAM-dT] G [THF] C T GAC AGA
TTA CGT AAA TTT -[3'-block]
3. PMMoVnfo – 5,584 R:
5'- [Biotin] TTCTCTTACCTACATACTTATTACTTCCTTTCTTA -3'

<그림 1-98> RT-RPA nfo primer probe set of PMMoV.

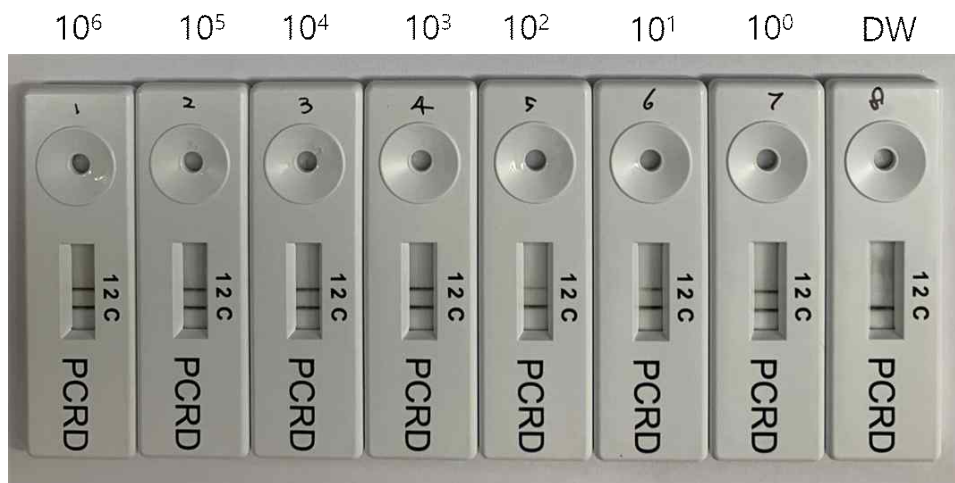
- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT PMMoV primer & probe set를 응용하여 PCR을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-98).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- nfo 반응 시간을 15분한 것과 20분 한 것 모두에서 육안 관찰이 확실한 반응이 관찰되었다. PCR에 올린 후 20분까지도 음성 대조군인 증류수에서 반응이 없어 백그라운드도 없는 좋은 프라이머 프로브 세트인 것으로 판단되었다 (그림 1-99).
- 5가지의 고추관련바이러스중에서 PMMoV와만 반응을 하였다 (그림 1-100).
- 검출한계는 1 copies/ul 까지 가능하였다 (그림 1-101).



<그림 1-99> RT-RPA nfo primer probe set of PMMoV.



<그림 1-100> RT-RPA nfo reaction with PMMoV primer and probe set.



<그림 1-101> LoD of RT-RPA nfo reaction with PMMoV primer and probe set.

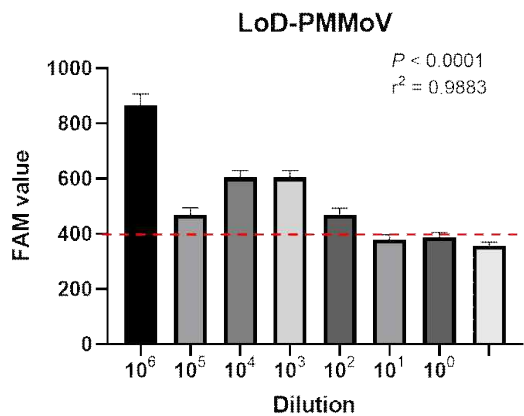
■ PMMoV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과

PMMoV		PepMoV		TSWV		DW	10 ⁵
1	2	1	2	1	2		
1088	994	390	360	321	363	340	583
1084	989	389	389	320	363	339	582

BBWV-Ca		BBWV-Ph		CMV-RS		DW	0.1 ng
1	2	1	2	1	2		
453	404	462	601	465	421	453	994
455	406	466	607	468	423	456	998

<그림 1-102> RT-RPA end point detection reaction with PMMoV primer set.

10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
896	487	432	623	486	392	377	350
838	452	410	587	454	369	401	367



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PMMoVnfo F	1.0 ul
PMMoVnfo R	1.0 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.9 ul
Total	20 ul

<그림 1-103> LoD of PMMoV RT-RPA end point detection kit.

- 사이버그린을 이용한 PMMoV end point detection kit의 특이도를 알아본 결과 5개의 고추 관련 바이러스 중에서 PMMoV와만 잘 반응하였다 (그림 1-102).
- PMMoV end point detection kit의 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-103).

7. Tomato spotted wilt virus (TSW) - RPA probe 진단제 개발



Tomato spotted wilt virus - Wikiped...
en.wikipedia.org



Tomato resistance-breaking TSWV...
tomatonews.com



Peppers Get Tomato Spotted Wilt ...
nwdistrict.ifas.ufl.edu



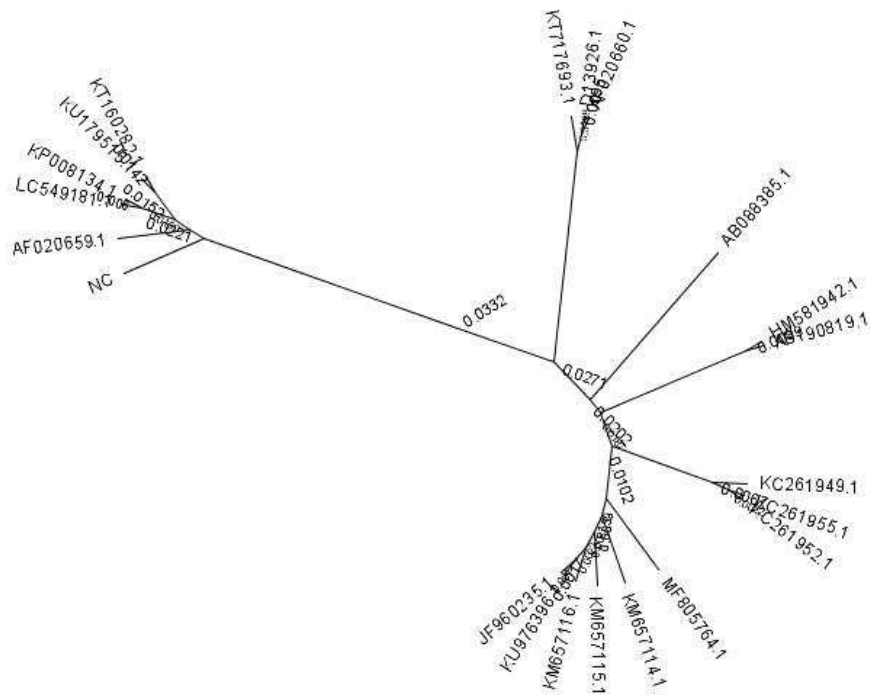
Symptoms of Tomato spotted wilt ...
researchgate.net

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

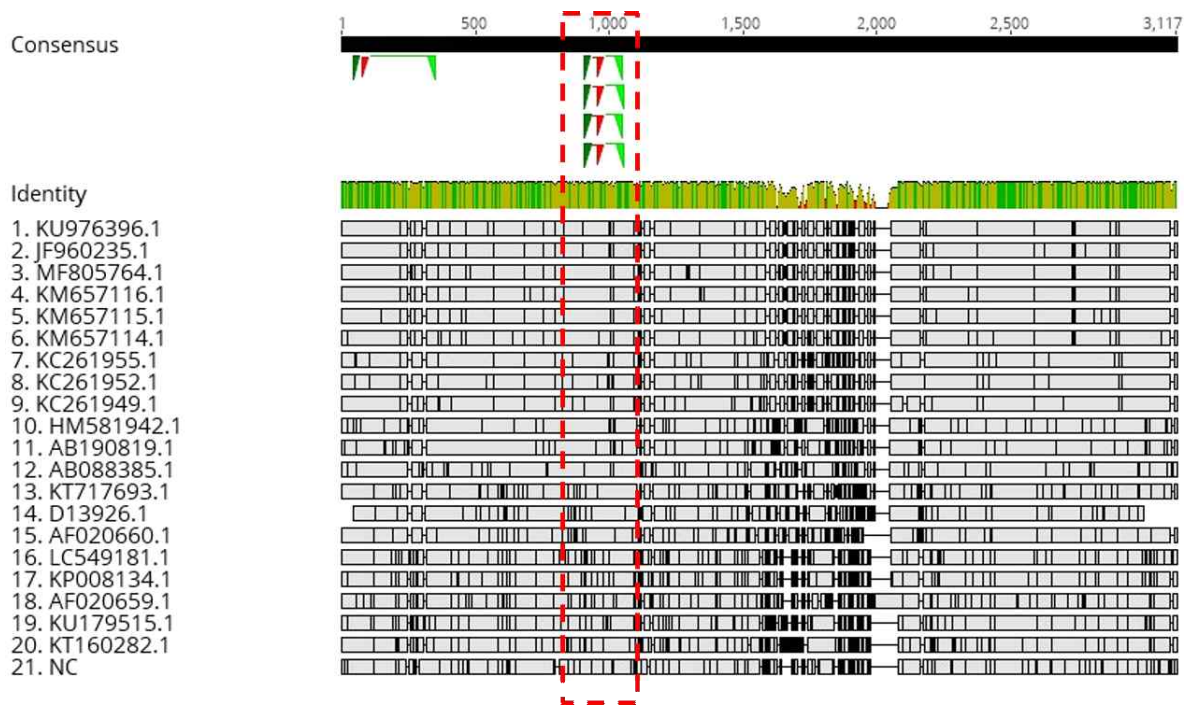


	KU976...	JF902...	MF805...	KM657...	KM657...	KM657...	KC261...	KC261...	KC261...	HM581...	AB190...	AB088...	KT717...	D1392...	AF020...	LC549...	KP008...	AF020...	KU179...	KT160...	NC
KU976396.1	99.8%	99.8%	99.3%	99.7%	99.5%	99.3%	97.7%	98.0%	97.9%	94.9%	95.6%	95.0%	92.9%	92.3%	93.0%	90.3%	90.7%	88.6%	90.1%	90.3%	88.3%
JF90235.1	99.8%	99.8%	99.2%	99.6%	99.4%	99.3%	97.7%	97.9%	97.8%	94.8%	95.5%	94.9%	92.9%	92.3%	92.9%	90.2%	90.6%	88.6%	90.0%	90.3%	88.2%
MF805764.1	99.3%	99.2%	99.3%	99.3%	99.1%	99.0%	97.4%	97.6%	97.5%	94.6%	95.3%	94.5%	92.6%	91.9%	92.6%	89.8%	90.2%	88.3%	89.7%	90.0%	88.0%
KM657116.1	99.7%	99.6%	99.3%	99.6%	99.6%	99.4%	97.8%	98.0%	97.9%	94.9%	95.6%	94.9%	92.9%	92.3%	93.0%	90.2%	90.6%	88.6%	90.1%	90.3%	88.3%
KM657115.1	99.5%	99.4%	99.1%	99.6%	99.4%	99.4%	97.7%	97.9%	97.8%	94.8%	95.5%	94.8%	92.9%	92.2%	92.9%	90.1%	90.5%	88.5%	90.0%	90.3%	88.2%
KM657114.1	99.3%	99.3%	99.0%	99.4%	99.4%	99.4%	97.5%	97.7%	97.6%	94.8%	95.4%	94.7%	92.7%	92.2%	92.8%	90.0%	90.4%	88.4%	89.9%	90.1%	88.1%
KC261955.1	97.7%	97.7%	97.4%	97.8%	97.7%	97.5%	97.5%	99.4%	98.3%	94.6%	95.2%	94.5%	92.7%	92.1%	92.7%	90.1%	90.4%	88.4%	90.0%	90.1%	87.9%
KC261952.1	98.0%	97.9%	97.6%	98.0%	97.9%	97.7%	99.4%	98.5%	98.5%	94.7%	95.4%	94.6%	93.0%	92.4%	93.0%	90.2%	90.5%	88.6%	90.2%	90.3%	88.2%
KC261949.1	97.9%	97.8%	97.5%	97.9%	97.8%	97.6%	98.3%	98.5%	98.5%	94.7%	95.3%	94.6%	92.7%	92.1%	92.8%	90.0%	90.4%	88.5%	90.0%	90.1%	88.0%
HM581942.1	94.9%	94.8%	94.6%	94.9%	94.8%	94.8%	94.6%	94.7%	94.7%	97.0%	94.5%	92.6%	92.2%	92.5%	89.8%	90.0%	88.4%	89.9%	90.2%	88.0%	
AB190819.1	95.6%	95.5%	95.3%	95.6%	95.5%	95.4%	95.2%	95.4%	95.3%	97.0%	94.9%	93.2%	92.6%	92.8%	90.1%	90.5%	88.6%	90.2%	90.1%	88.4%	
AB088385.1	95.0%	94.9%	94.5%	94.9%	94.8%	94.7%	94.5%	94.6%	94.6%	94.5%	94.9%	93.1%	93.1%	93.1%	90.9%	91.2%	89.2%	90.8%	90.6%	88.9%	
KT717693.1	92.9%	92.9%	92.6%	92.9%	92.9%	92.7%	92.7%	93.0%	92.7%	92.6%	93.2%	93.1%	95.5%	95.5%	94.8%	90.3%	90.7%	88.8%	90.5%	90.1%	88.5%
D13926.1	92.3%	92.3%	91.9%	92.3%	92.2%	92.2%	92.1%	92.4%	92.1%	92.2%	92.6%	93.1%	95.5%	95.5%	95.8%	91.4%	91.7%	90.0%	91.5%	91.1%	89.1%
AF020660.1	93.0%	92.9%	92.6%	93.0%	92.9%	92.8%	92.7%	93.0%	92.8%	92.5%	92.8%	93.1%	94.8%	95.8%	95.8%	91.1%	91.5%	88.6%	91.2%	91.2%	89.1%
LC549181.1	90.3%	90.2%	89.8%	90.2%	90.1%	90.0%	90.1%	90.2%	90.0%	89.8%	90.1%	90.9%	90.3%	91.4%	91.1%	91.1%	91.1%	98.5%	93.9%	94.7%	93.5%
KP008134.1	90.7%	90.6%	90.2%	90.6%	90.5%	90.4%	90.4%	90.5%	90.4%	90.0%	90.5%	91.2%	90.7%	91.7%	91.5%	98.5%	94.2%	95.1%	94.1%	93.9%	
AF020659.1	88.6%	88.6%	88.3%	88.6%	88.5%	88.4%	88.4%	88.6%	88.5%	88.4%	88.6%	89.2%	88.8%	90.0%	88.6%	93.9%	94.2%	92.2%	91.4%	91.1%	
KU179515.1	90.1%	90.0%	89.7%	90.1%	90.0%	89.9%	90.0%	90.2%	90.0%	89.9%	90.2%	90.8%	90.5%	91.5%	91.2%	94.7%	95.1%	92.2%	96.0%	93.8%	
KT160282.1	90.3%	90.3%	90.0%	90.3%	90.3%	90.1%	90.1%	90.3%	90.1%	90.2%	90.1%	90.6%	90.1%	91.1%	91.2%	93.7%	94.1%	91.4%	96.0%	92.6%	
NC	88.3%	88.2%	88.0%	88.3%	88.2%	88.1%	87.9%	88.2%	88.0%	88.0%	88.4%	88.9%	88.5%	89.1%	89.1%	93.5%	93.9%	91.1%	93.8%	92.6%	

<그림 1-104> Homology distance of 21 cases of TSWV isolates.



<그림 1-105> Phylogenetic tree of 21 cases of TSWV isolates.



<그림 1-106> Region of RPA exo primer and probe set candidates of 21 cases of TSWV isolates.

1. TSWV-906 F:

5'- AAACAAACAAAACATTTTATTTATCTATTGCTTGC -3'

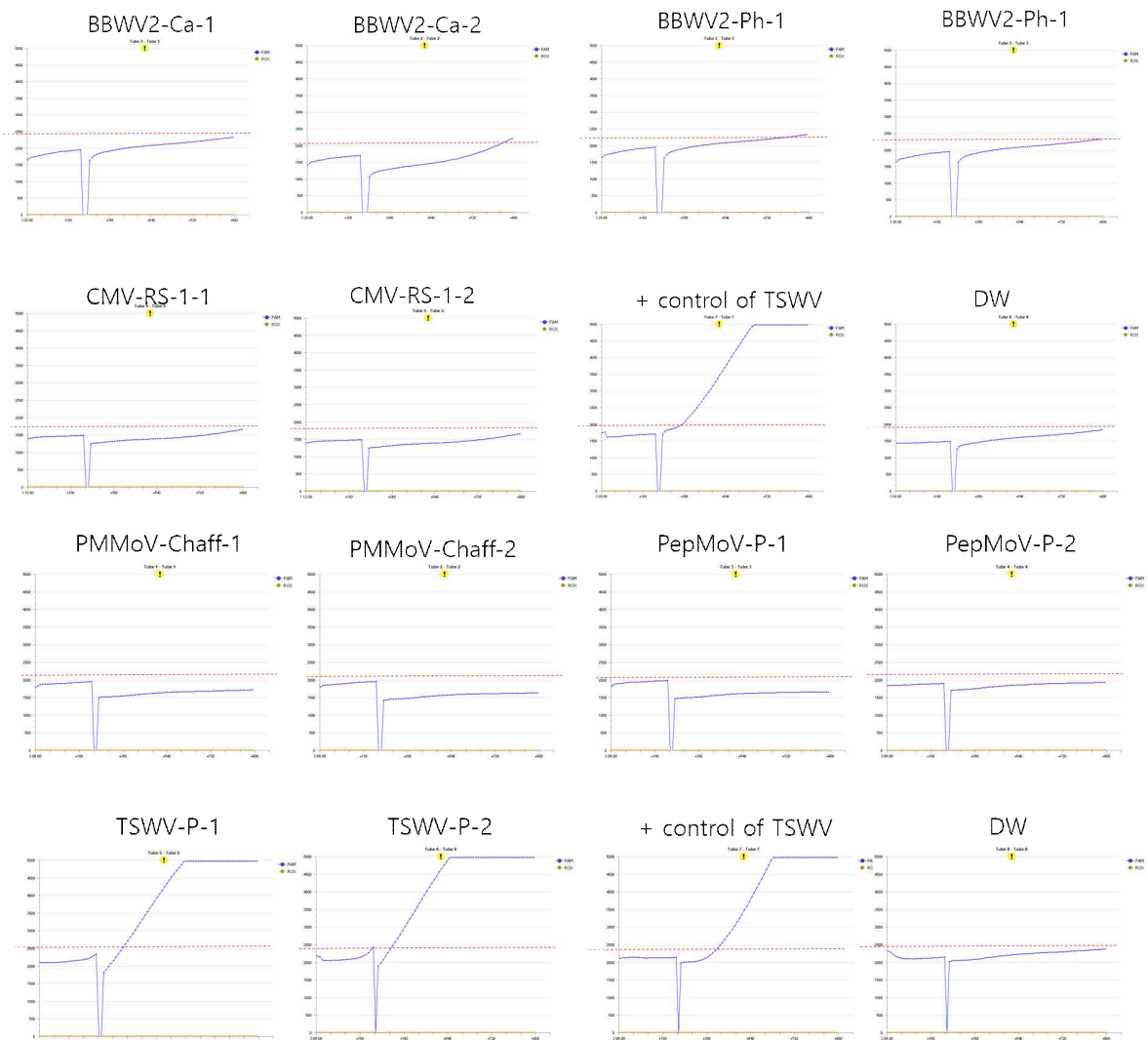
2. TSWV-956 P :

5'- ACC ATA ACA GTG TTG AGA CAG CTT TAA ACA [FAM-dT] T [THF] C [BHQ1-dT] GTT ATT
TGC AAG CAT -[3'-block]

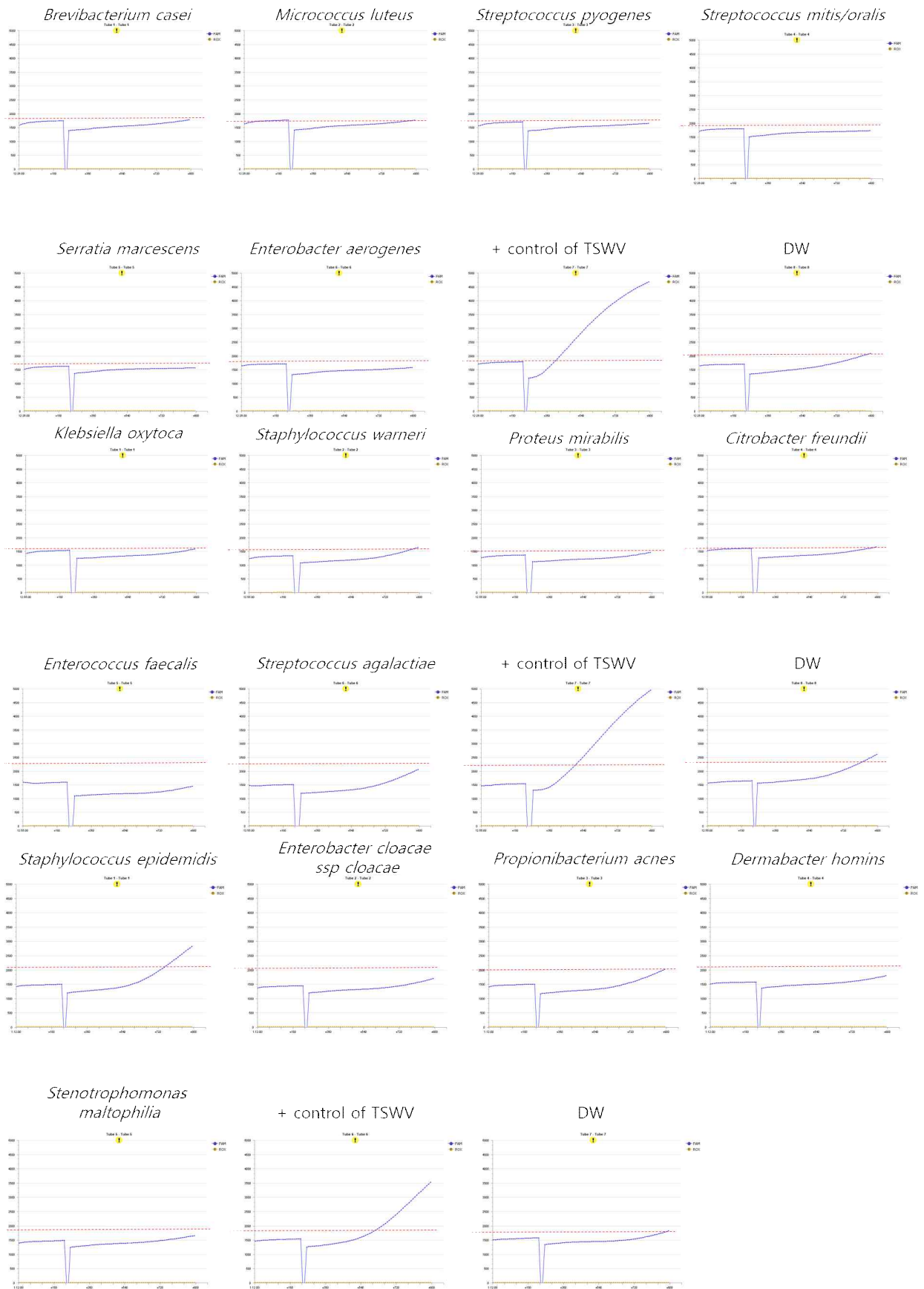
3. TSWV-1,057 R:

5'- TAAATCAGAAAACATCATTGATAATTCAAAGGAG -3'

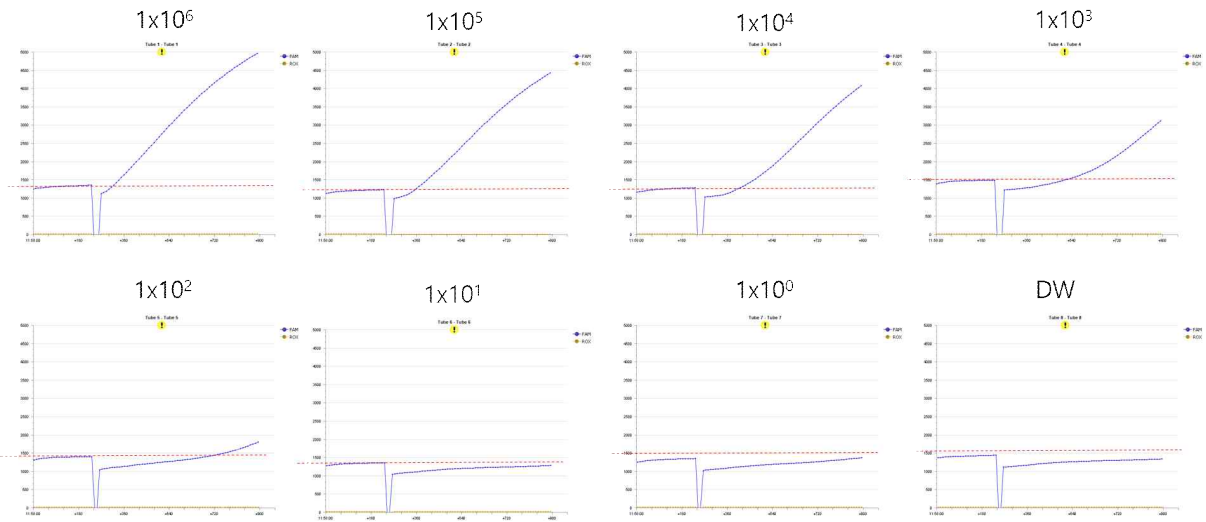
<그림 1-107> RPA exo primer and probe set of 21 cases of TSWV isolates.



<그림 1-108> RT-RPA exo reaction with TSWV primer and probe set.



<그림 1-109> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of TSWW with several bacteria.



<그림 1-110> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of TSWV.

- TSWV isolates 21건에 대한 유전자를 분석한 결과, 크게 두 개의 그룹으로 나누어지고 있었으나 분리주간에 크게는 10%이상의 변이가 관찰되었다 (그림 1-104, 105).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, 5' 쪽에서 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; TSWV-906F, TSWV-956P, TSWV-1057R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-106, 107).
- RPA Exo kit를 사용하여 5가지의 고추관련 바이러스들 (CMV, BBWV, PMMoV, PepMoV, TWSV)과 교차반응을 조사한 결과, TSWV에만 잘 반응하였다 (그림 1-108).
- Exo RT RPA 반응은 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시켰고 음성대조군인 증류수와는 반응이 없었다 (그림 1-108).
- 17건의 박테리아에 대한 유전자와 반응에서는 TSWV primer와 probe 세트가 반응을 하지 않아 100%의 특이도를 보였다 (그림 1-109).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul 까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시킨 결과, 100 copies까지 검출이 되었다 (그림 1-110).
- 이상의 결과로 RT-RPA TSWV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-111, 112).



<그림 1-111> TSWV ER detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-TSWV-ER-50

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-TSWV-ER-0001
Issue Date: Aug 13, 2021
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Backto-ri Hyangnam-cup Hwasong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@naver.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of segment S gene to detect the TSWV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Tomato spotted wilt virus (TSWV) is an important disease of many different crops grown in temperate and subtropical regions of the world. TSWV is a unique virus in a virus class by itself. The host range for TSWV is one of the widest known for plant viruses. It infects over 1,000 species in 85 families, including both monocots and dicots. The virus has been confirmed in begonia, cowpea, impatiens, peanut, pepper, potato, squash, and tomato. Other common hosts include celery, cucumber, eggplant, lettuce, onion, peppermint, spinach, watermelon, many legumes, many ornamentals, and many weeds such as curly dock, field bindweed, and pigweed. This disease is especially damaging in the ornamental and vegetable greenhouse industries. Symptoms of TSWV are numerous and varied. However, there are two fairly common symptoms for which this disease was named. First, the young leaves turn bronze and subsequently develop numerous small, dark spots. Second, the leaves often droop on the plant, creating a wilt-like appearance. Other symptoms include dieback of the growing tips, stunting, mottling, and dark streaking of the terminal stems. Affected plants may develop a one-sided growth habit or may be stunted completely. Plants that are affected early in the growing season often do not produce any fruit, while those infected after fruit set produce fruit with striking symptoms, including chlorotic concentric ring spots, raised bumps, uneven ripening, and deformation. TSWV is transmitted from infected plants to healthy plants by at least ten species of thrips. Thrips are tiny (approximately 1/16 of an inch) winged insects that feed on plants through sucking mouthparts. Thrips transmit the virus in a persistent propagative manner, which means that once the insect has picked up the virus, the virus replicates within the insect and the insect is able to transmit the virus for the remainder of its life. The virus is not passed on from adult to egg; however, progeny that develop on infected plants will quickly pick up the virus and be effective spreaders of the disease.

The Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of TSWV by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the movement protein gene for the unique amplification of TSWV RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	TSWV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	TSWV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	TSWV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	TSWV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	TSWV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	TSWV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	TSWV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

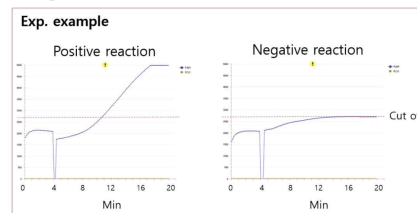
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of TSWV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	Segment S gene	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	TSWV Positive
2	+	-	-	TSWV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-112> Insert of PMMoV ER detection kit.

■ TSWV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. TSWVnfo-906 F:

5'- AAACAAACAAAACATTTTATTTATCTATTGCTTGC -3'

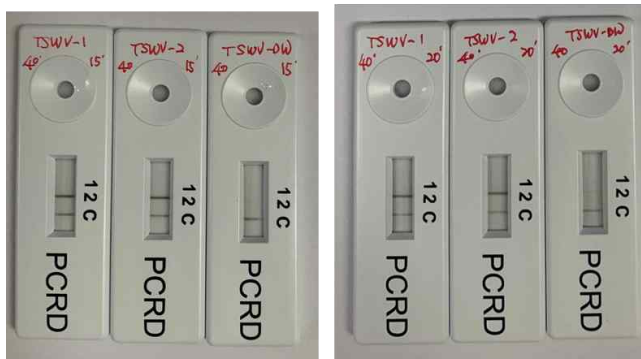
2. TSWVnfo-956 P :

5'- [FAM] ACC ATA ACA GTG TTG AGA CAG CTT TAA ACA T [THF] C T GTT ATT
TGC AAG CAT -[3'-block]

3. TSWVnfo-1,057 R:

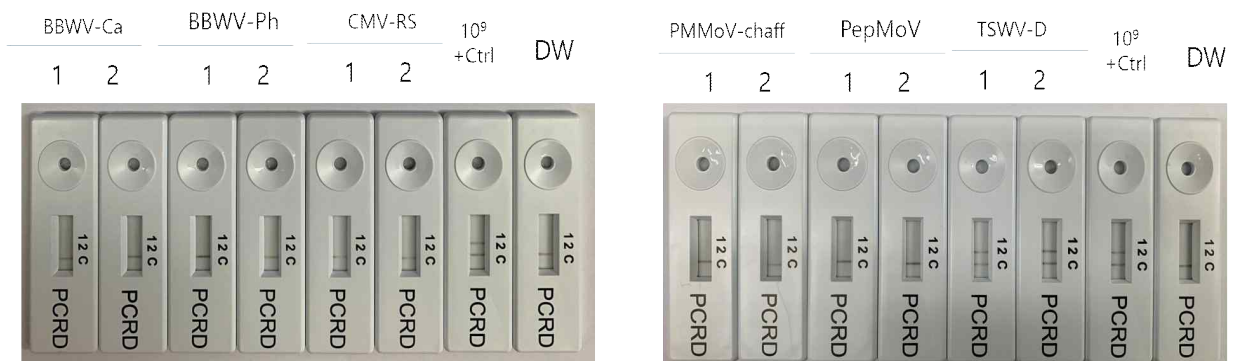
5'- [Biotin] TAAATCAGAAAACATCATTGATAATTCAAAGGAG -3'

<그림 1-113> RT-RPA nfo primer probe set of TSWV.

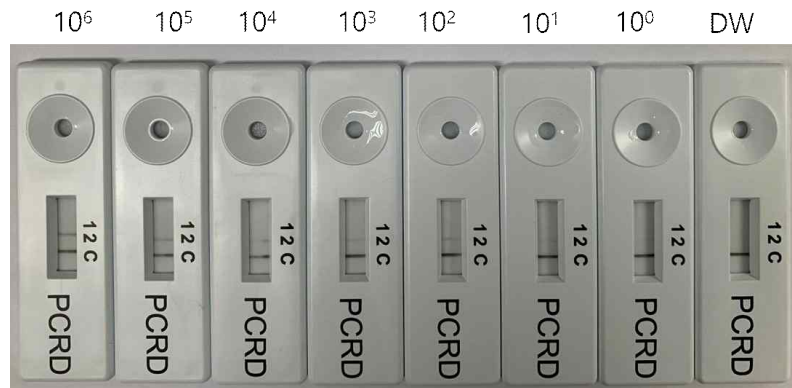


Primer free R buffer	29.5 ul
TSWVnfo-906F	2.1 ul
TSWVnfo-1057R	2.1 ul
TSWVnfo-956P	0.3 ul
RT	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	11.5 ul
MgOAc	2.5 ul
Total	50 ul

<그림 1-114> RT-RPA nfo reaction with TSWV primer and probe set.



<그림 1-115> TSWV RT-RPA nfo reaction with several related viruses.



<그림 1-116> LoD of RT-RPA nfo reaction with TSWV primer and probe set.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT TSWV primer & probe set를 응용하여 PCRD을 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe들을 합성하였다 (그림 1-113).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- nfo 반응 시간을 15분한 것과 20분 한 것 모두에서 육안 관찰이 확실한 반응이 관찰되었다. PCRD에 올린 후 20분까지도 음성 대조군인 증류수에서 반응이 없어 백그라운드도 없는 좋은 프라이머 프로브 세트인 것으로 판단되었다 (그림 1-114).
- 5가지의 고추관련바이러스중에서 PMMoV와만 반응을 하였다 (그림 1-115).
- 검출한계는 10 copies/ul 까지 가능하였다 (그림 1-116).

■ 공동연구기관-강원대 연구결과

1. 진단 대상 식물바이러스 수집, 바이러스 핵산 분리 및 보관

○ 고추 감염 식물바이러스 수집, 바이러스 핵산 분리 및 보관

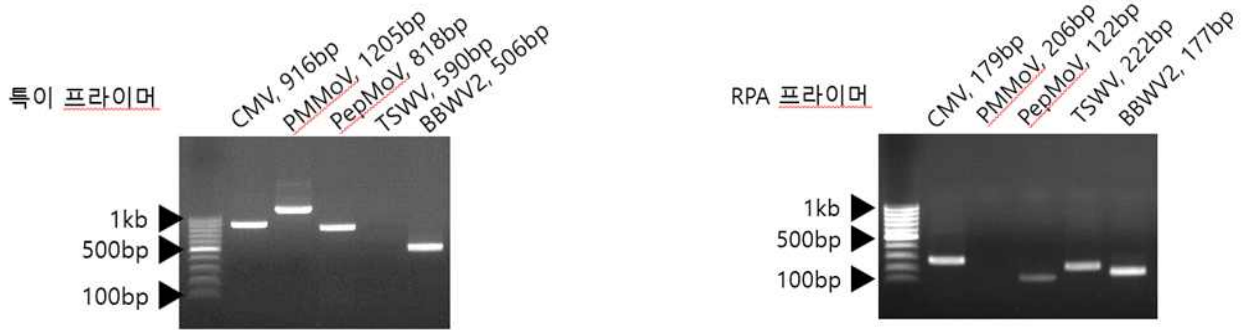
- 주요 고추 감염 식물바이러스 (CMV, PepMoV, PMMoV, BBWV, TSWV)의 바이러스 핵산 분리 및 최적검정을 위한 프라이머 테스트를 위해 바이러스별 두 가지 이상의 프라이머를 제작 (표 1)

표 1. 고추 감염 바이러스 대상 프라이머

Primer	Sequence (5' → 3')
PMMoV-6F	GTT GTG TCC GGG GAG TGG AAC C
PMMoV-6R	TGG GCC GCT ACC CGC GGT TC
PepMoV-CP_5	AGC AGC TCA AGA TCA GAC AC
PepMoV-CP_3	CAT ATT TCT GAC CCC AAG CAG
CMV-CP-5'	ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AG
CMV-CP-3'	TCA GAC TGG GAG CAC TCC A
TSWV-CP-5	GCT GGA GCT AAG TAT AGC AGC
TSWV-CP-3	CAC AAG GCA AAG ACC TTG AG
BBWV(506)-5	GGT GAG CAG TTT GTC AGA AGT
BBWV(506)-3	CCA GAT AAT GCA TAT TCC ACC

Primer	Sequence (5' → 3')
RPA_PMMoV_6038_F	GAC GGT GGC CAT TAG GGC CAG TAT AAG TAA
RPA_PMMoV_6244_R	CGA TTT AAG TGG AGG GAA AAA CAC TAC GAG
RPA_PepMoV_9195_F	TAC GTC AAC ACG TGC TCG CGA AGC CCA TAT
RPA_PepMoV_9317_R	TGG CGC TCT GTG TTT TCT CCT TGT GTT CCT
RPA_CMV_R3_1608_F	GAA ATT TGA TTC TAC CGT GTG GGT TAC AGT
RPA_CMV_R3_1787_F	CTG ATA TAG GTG ACA TGA GAA AGT ACG CCG
RPA_TSWV_N_276_F	TAG CCA AGA CAA CAC TGA TCA TCT CAA AGC
RPA_TSWV_N_498_R	AGA AGG CTT GAT AGC TTG ATC AGG GTC AGG
RPA_BBWV2_3353_F	TGG CTC KRA TGT CGA ATT TGC TGG CCA ACA
RPA_BBWV2_3530_R	AGG TCA TGG AAC CCA TTT TAA TGG GAG GCT

- 프라이머별 바이러스 핵산 검정 결과가 일부 차이가 있음을 확인함 (그림 1)

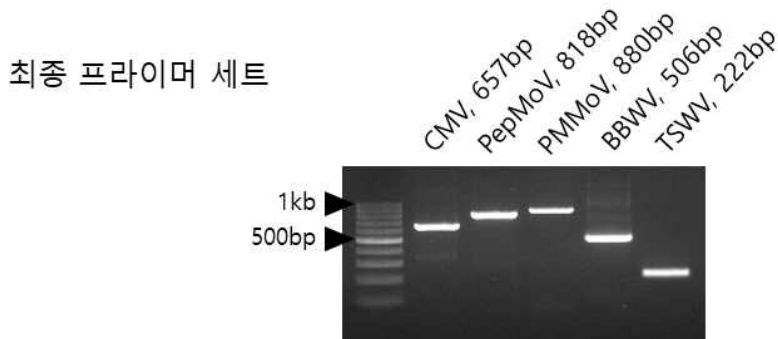


<그림 1> 프라이머에 따른 고추 감염 바이러스 검정

- 이에 따라, 최적 바이러스 검정을 위한 각 증폭산물의 크기가 유의미하게 차이나는 최종 프라이머 세트를 선발하여 이후 실험에 이용함 (표 2, 그림 2)

표 2. 최종 고추 감염 바이러스 대상 프라이머

Primer	Sequence (5' → 3')
CMV-Fny-CP-5'	ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AG
CMV-Fny-CP-3'	TCA GAC TGG GAG CAC TCC A
PepMoV-CP_5	AGC AGC TCA AGA TCA GAC AC
PepMoV-CP_3	CAT ATT TCT GAC CCC AAG CAG
TobamodF	TKG AYG GNG TBC CNG GNT GYG G
TobamodR	ACN GAV TBN ABC TGT AAT TGC TAT
BBWV(506)-5	GGT GAG CAG TTT GTC AGA AGT
BBWV(506)-3	CCA GAT AAT GCA TAT TCC ACC
RPA_TSWV_N_276_F	TAG CCA AGA CAA CAC TGA TCA TCT CAA AGC
RPA_TSWV_N_498_R	AGA AGG CTT GAT AGC TTG ATC AGG GTC AGG



<그림 2> 최종 프라이머를 활용한 고추 감염 바이러스 핵산 검정

2. In vitro RNA, 온실 수준 및 농가포장시료에 대한 진단검사 및 유용성 평가

○ 고추 농가에서 바이러스 병징으로 보이는 시료를 채집함 (그림 3)



<그림 3> 고추 농가 포장 시료에서의 식물 바이러스 병징

- 고추 시료의 진단검사에 앞서 채집된 시료에 대한 품종 및 병징에 따른 분류를 실시한 결과 다양한 패턴의 병징 확인함 (표 3)

표 3. 농가에서 채집한 고추 품종 및 병징

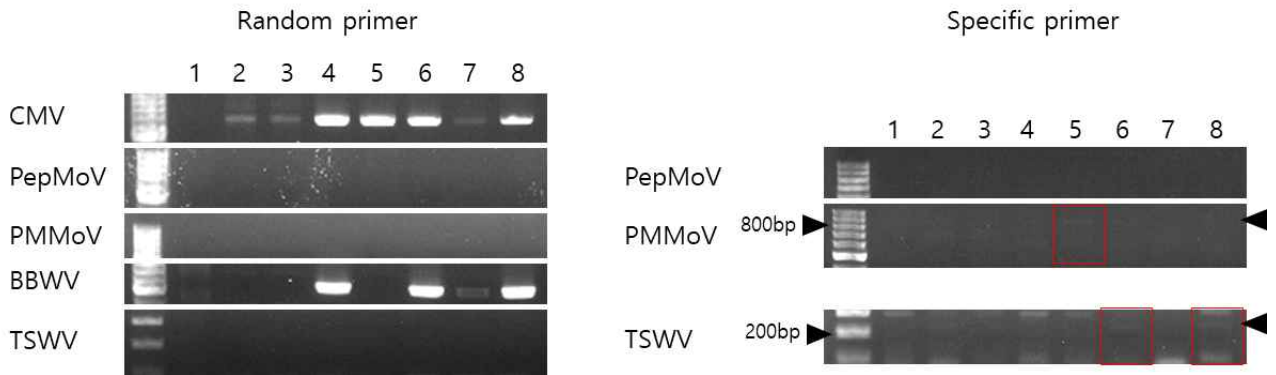
Cultivars	Symptoms
1. 엄지아삭이고추	Necrotic ring spot, Yellowing
2. 청양고추	Mosaic, Mottle
3. 청양고추	Chlorotic spots
4. 오이고추	Mosaic
5. 가지고추	Mosaic
6. 파리고추	Stem necrosis, Mosaic
7. 비타민고추	Necrotic spots
8. 파프리카	Mosaic, Mottle, Rugose

- RPA를 활용한 진단 시스템과 기존 바이러스 검정 시스템인 conventional RT-PCR과의 비교를 위해 검정을 수행하였으며, hexamer로 이루어진 Random primer를 이용한 역전사 산물의 경우 PMMoV 및 TSWV가 확인되지 않았지만, 특히 프라이머를 이용한 역전사 반응시 감염이 확인되어 conventional RT-PCR 활용시 특히 프라이머를 이용한 역전사 반응이 요구됨을 확인함 (표 4, 그림 4)

- PepMoV의 경우 8가지 시료에서 바이러스가 검정되지 않음 (표 4, 그림 4)
- 또한 다수 시료에서 CMV, PMMoV, BBWV, TSWV의 감염과 해당 바이러스들의 복합 감염이 확인되었으며, 특히 파리고추와 파프리카의 경우 CMV, BBWV, TSWV 세 종의 바이러스가 동시에 복합감염되는 형태를 보임 (표 4, 그림 4)
- 이러한 감염 형태가 병징 분류와 일치하지 않는 특성이 있어 육안으로는 바이러스 진단이 어려우며 현장 진단시스템 구축이 요구됨 (표 3, 표 4, 그림 4)

표 4 농가에서 채집한 고추 시료의 바이러스 검정

Virus	Pepper cultivars							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CMV	X	O	O	O	O	O	O	O
PepMoV	X	X	X	X	X	X	X	X
PMMoV	X	X	X	X	O	X	X	X
BBWV	X	X	X	O	X	O	O	O
TSWV	X	X	X	X	X	O	X	O



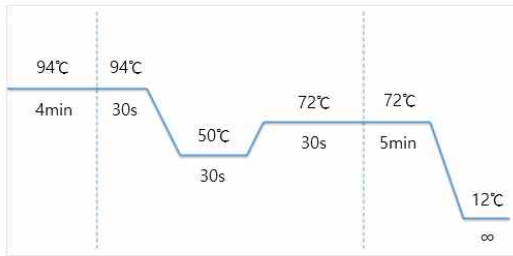
<그림 4> 농가에서 채집한 고추 시료의 conventional RT-PCR 검정

3. 기존 진단법(real time PCR, conventional PCR, 항체진단법 등)과 RPA real-time detection kit와 민감도와 특이도 비교

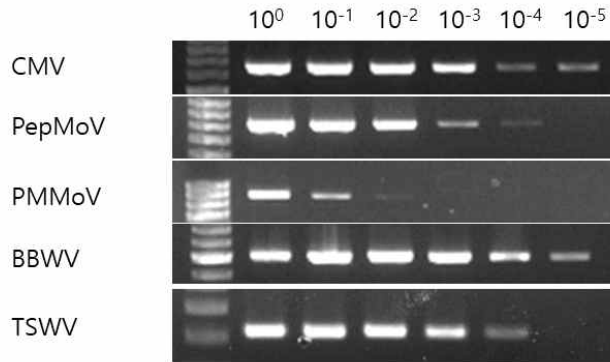
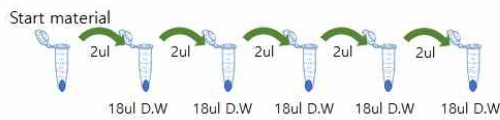
- 고추에 감염된 바이러스의 효율적인 진단을 위한 민감도 테스트
 - 고추 바이러스 감염 식물로부터 total RNA를 추출하여 nanodrop 기기를 이용해 RNA 농도 측정 및 50ng/ul로 표준화 하였으며, 이를 10⁻⁵ 단계까지 희석하여 conventional RT-PCR 및 RPA 시스템을 이용해 민감도를 측정함 (그림 5)

Total RNA를 약 50ng/ul으로 표준화하여 진행

PCR condition



Dilution



<그림 5> RNA 희석에 따른 고추 감염 바이러스 검출 한계 분석

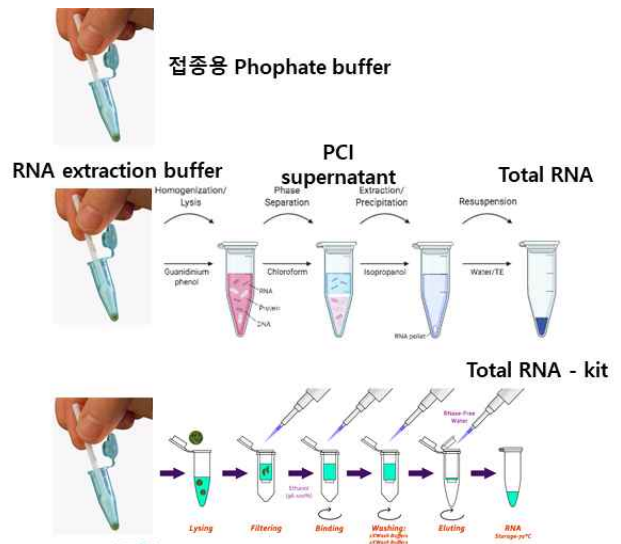
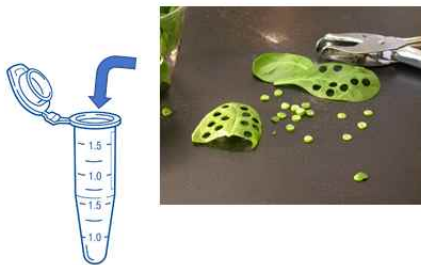
- conventional PCR에서는 CMV와 BBWV는 10^{-5} 까지, PepMoV와 TSWV는 10^{-4} 까지의 높은 검출 한계가 확인되었으나, PMMoV의 경우 10^{-2} 까지 검정되어 낮은 검출 한계를 나타내었음 (그림 5)

- RPA real-time detection kit의 민감도 테스트

○ 현장에서의 효율적인 진단을 위한 RNA 추출에 따른 특이도 테스트

- 다양한 RNA 추출 기법을 이용하여 바이러스를 검정함
- 바이러스 시료는 고추 감염 바이러스가 감염된 식물로부터 leaf disc를 두 장으로 표준화 하여 수행하였으며, 이를 각각 단순 접종 버퍼와 실험실 환경에서의 total RNA 추출 및 RNA 추출 키트를 활용한 방법을 활용해 5단계로 RNA 추출 방법을 나누었음 (그림 6)

1 tube에 바이러스 시료 leaf disc 두 장으로 표준화 하여 실험



<그림 6> 특이도 분석을 위한 RNA 추출 방법

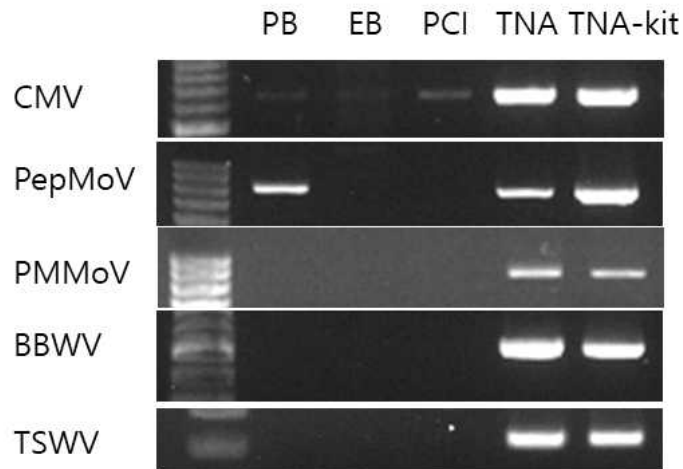
- 모든 고추 감염 바이러스는 total RNA 추출 및 RNA 추출 키트를 활용한 conventional RT-PCR 에서 핵산이 검정되었으나, 단순 RNA extraction 버퍼 또는 PCI 정제 기법에서는 검정되지 않음

(표 5, 그림 7)

- CMV의 경우 모든 RNA 추출 방법에서 바이러스의 존재를 확인할 수 있었으며, PepMoV의 경우 단순 접종 버퍼를 이용해 마쇄하였을 때, 바이러스가 검정됨 (표 5, 그림 7)

표 5. RNA 추출 방법에 따른 고추 감염 바이러스 검정

Virus	RNA extraction materials				
	Phosphate buffer	RNA extraction buffer	PCI supernatant	PCI+EtOH precipitation	RNA extraction kit
CMV	O	O	O	O	O
PepMoV	O	X	X	O	O
PMMoV	X	X	X	O	O
BBWV	X	X	X	O	O
TSWV	X	X	X	O	O



PB, phosphate buffer; EB, RNA extraction buffer; PCI, PCI supernatant; TNA, Total RNA extraction using phenol and EtOH precipitation; TNA-kit; Total RNA extraction using plant RNA extraction kit

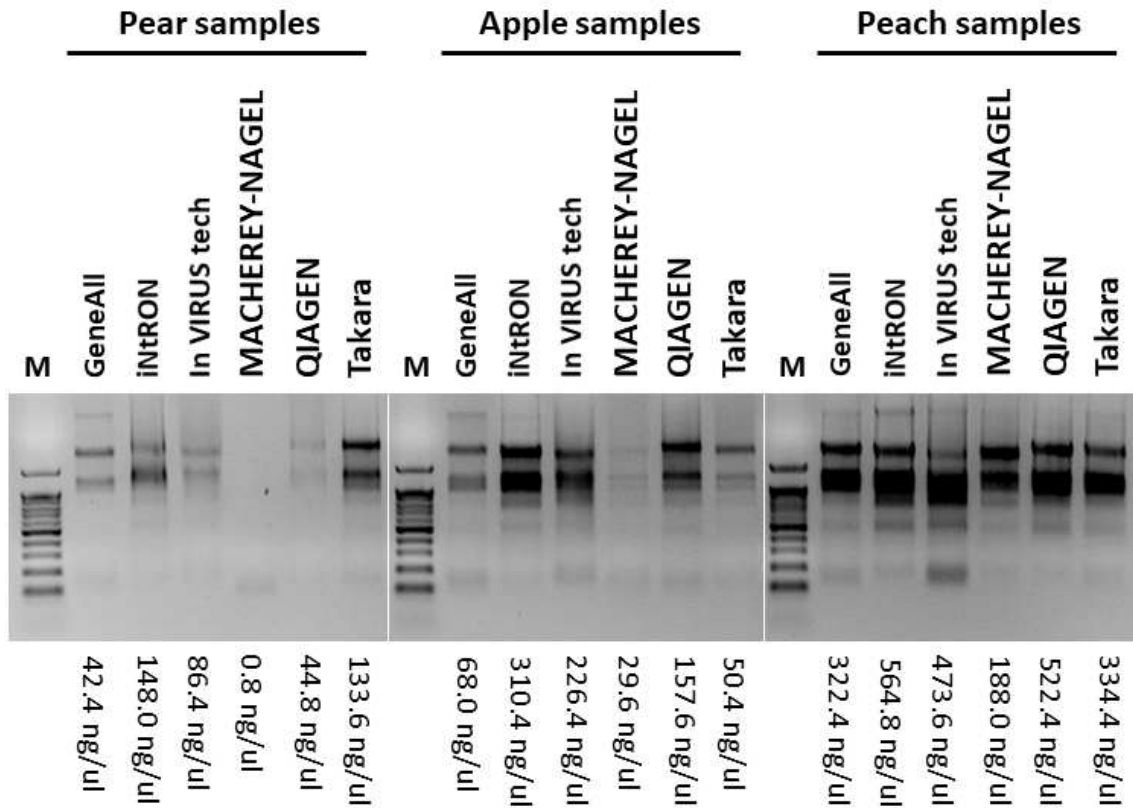
<그림 7> RNA 추출 방법에 따른 고추 감염 바이러스의 conventional RT-PCR 검정

■ 위탁연구기관-전남대 연구결과

1. 과수(사과, 배 등)바이러스 감염 식물로부터 진단을 위한 효율적인 핵산 추출 버퍼 확립

○ 국내 유통되고 있는 핵산 추출 kit 비교 분석

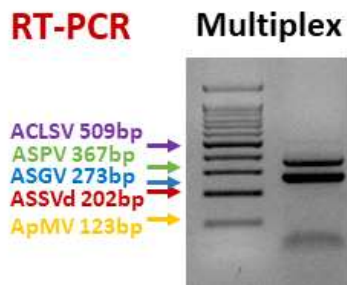
- 바이러스 감염된 배, 사과, 복숭아에서 효율적인 진단을 위해 과수에서 최적의 핵산 추출 키트를 찾고자 시중에 판매되고 있는 6개의 total RNA 추출 키트를 비교함.
- 비교한 키트 종류는 GeneAll, iNtRON, In VIRUS tech, MACHEREY-NAGEL, QIAGEN, Takara 사에서 판매되고 있는 RNA 추출 키트를 사용함. 추출 과정은 제조사에서 제공되는 설명서에 따라 수행함.
- 배, 사과, 복숭아에서 각 각의 키트를 비교한 결과, 농도와 Quality, 비용 측면에서 최종적으로 In VIRUS tech가 선택되었고 이 후 모든 실험에서 사용함.



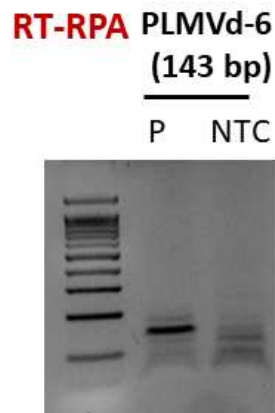
<그림 1> 핵산 추출 키트 비교

○ Filter paper를 활용한 현장 핵산 추출 방법 확립

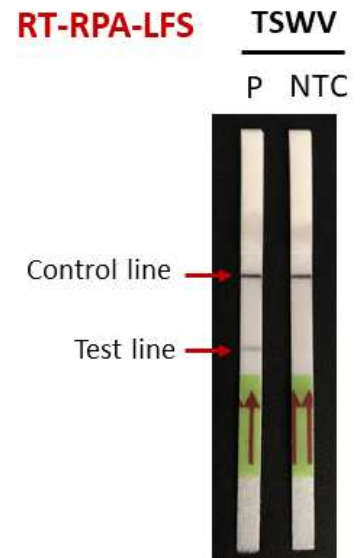
- Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 5분 만에 식물 시료에서 핵산을 쉽게 얻을 수 있는 방법을 확립하였고, 이를 통해 얻는 Filter paper-핵산을 사용하여 일반적인 RT-PCR과 현장진단용 기술인 RT-RPA, RT-RPA-LFS에 적용함(자세한 방법은 별첨 1를 참고).
- 바이러스 감염된 사과 시료에서 핵산을 추출하고 RT-PCR를 수행한 결과, Multiplex RT-PCR임에도 ASPV, ASGV가 복합 감염된 것으로 확인됨(그림 2).
- 복숭아 시료에서 핵산을 추출하고 PLMVd를 RT-RPA 방법으로 검출한 결과, Positive sample에서만 증폭됨(그림 3).
- TSWV가 감염된 고추시료에서 핵산을 추출하고 현장진단용 RT-RPA-LFS를 사용한 결과, Positive sample에서만 증폭됨(그림 4).
- Whatman No.1 Filter paper 기술을 통해 현장에서 5분 만에 빠르고, 특별한 장비 없이 쉽게 핵산을 확보하는 기술을 확립하였고, RT-PCR과 RT-RPA, 현장진단용 RT-RPA-LFS에서 적용이 가능하여 현장 진단에 유용하게 활용될 수 있음.



<그림 2> RT-PCR



<그림 3> RT-RPA



<그림 4> RT-RPA-LFS

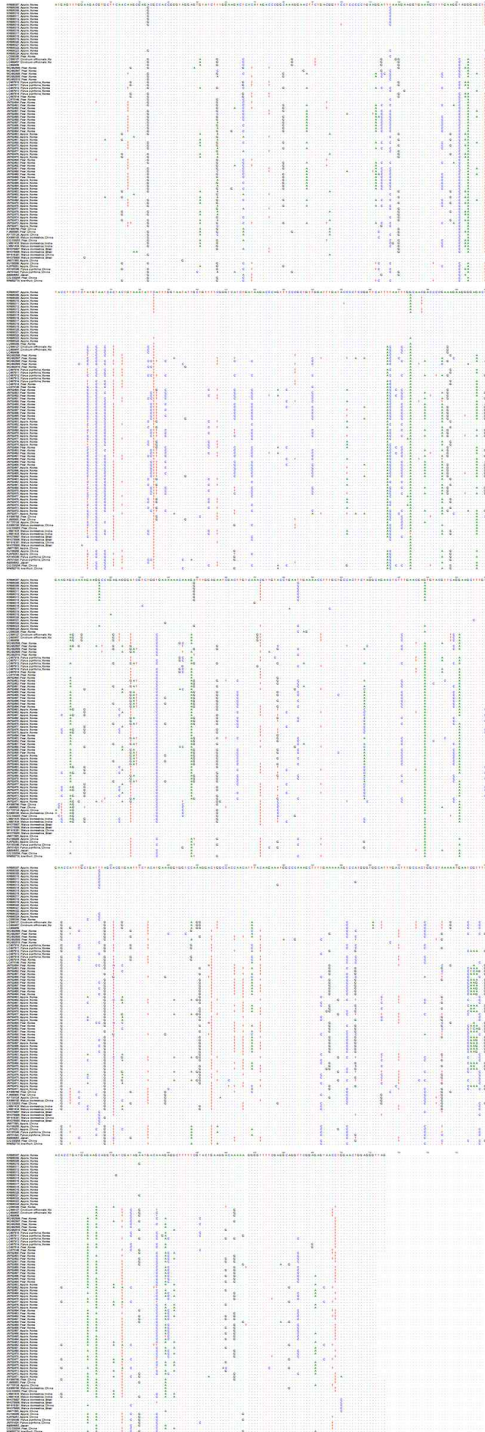
- Filter paper를 활용한 현장 핵산 추출 및 식물바이러스 검출 실험 수행함. Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 농업 현장에서 5분만에 식물 시료 핵산 추출 및 RT-RPA-LFS를 사용하여 바이러스 진단함 (그림 5).



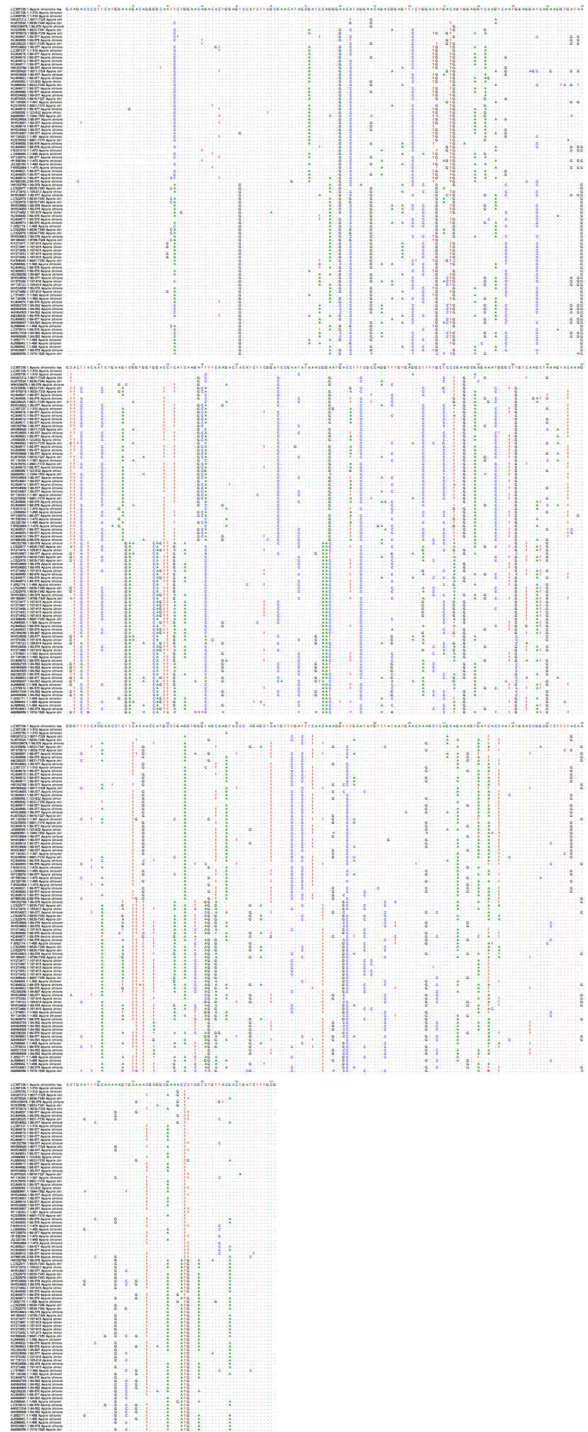
<그림 5> 추출버퍼를 활용한 RPA 이용 식물바이러스 현장 검출

2. 과수(사과, 배 등) 주요 바이러스 국내외 분리주 염기서열 확보 및 분석

- 과수 주요 바이러스를 진단하기 위한 프라이머를 제작하기 위해 국내외 염기서열 확보
- 배와 사과에서 문제가 되는 ASGV, ACLSV의 현장 진단 용 프라이머 및 프로브를 제작하기 위해 NCBI genbank에서 국내외 분리주를 90-100개 확보하였고, bioedit sequence alignment editor program를 사용하여 sequence alignment하여 보존된 영역을 확인함(그림 6,7).



<그림 6> ASGV 염기서열 alignmnet

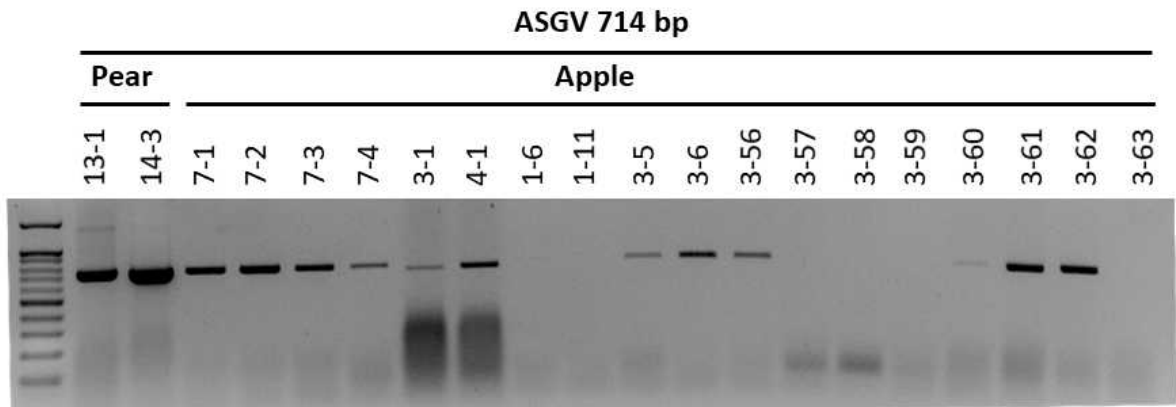
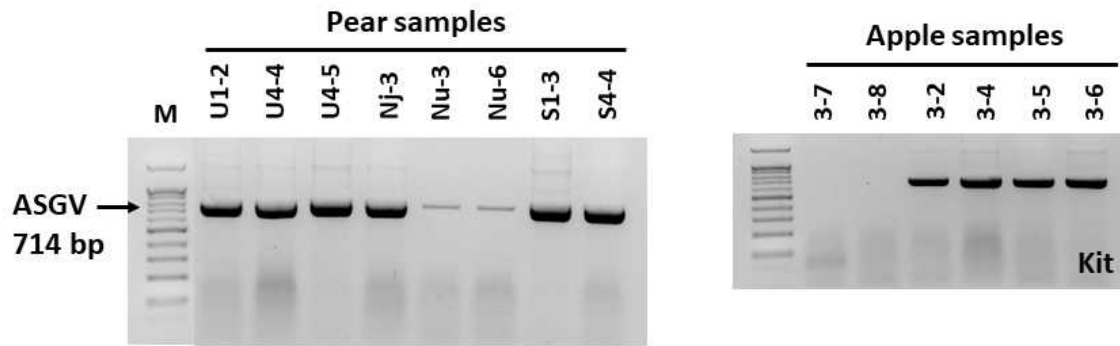


<그림 7> ACLSV 염기서열 alignmnet

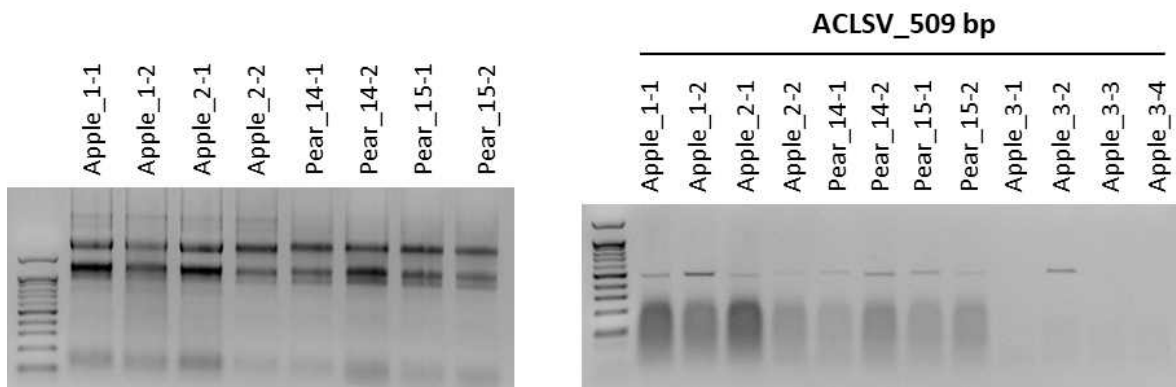
3. 과수(사과, 배 등) 주요 바이러스 시료 확보

○ 과수 주요 바이러스를 진단하기 위한 바이러스 감염 시료 확보

- 배와 사과 시료에서 total RNA를 추출하고, ASGV, ACLSV 진단 프라이머를 사용하여 RT-PCR를 수행함.
- ASGV-714 bp 진단 프라이머와 ACLSV-509 bp 진단 프라이머를 통해 ASGV의 경우 26개의 감염시료와 8개의 비감염 시료를 확보하였고(그림 8), ACLSV의 경우 9개의 감염시료와 3개의 비감염 시료를 확보함(그림 9).



<그림 8> ASGV 감염 시료 확보



<그림 9> ACLSV 감염 시료 확보

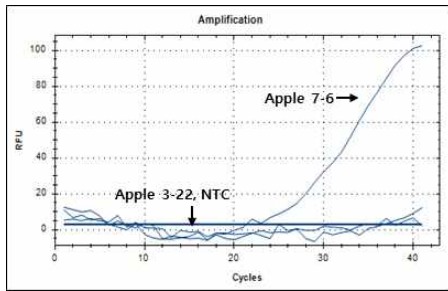
4. 과수(사과, 배 등)바이러스 신속진단을 위한 RT-RPA 조건 확립

- 엘씨엠싸이언스회사에서 제작한 Primer로 확인하기 위해 받음.

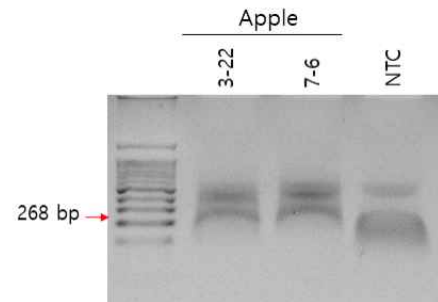
표 1. ACLSV에 대한 exo RPA 프라이머 및 프로브 서열

프라이머 프로브 이름	염기서열 5'-3'	증폭 크기(bp)
3775F	ATGAATGACTTTATTGGCATAGATGAACAA	
ACLSV 4042R	TTCTAAATCTTGTTATTGCCACCATTATGT	286
3849P	AAGAAAGGGAATCACATAGAAGTAATTCTTGTTG	

- ACLSV 특이적 프라이머 및 프로브셋을 사용하여 exo RPA를 통해 증폭여부를 실험함. exo RT-RPA 반응은 Twist Exo kit (TwistDX) 제품을 사용하여 제품의 protocol을 따라 수행되었음. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음(그림 10).
- ☞ ACLSV 감염이 확인된 사과 시료와 NTC를 조건으로 exo RPA를 수행한 이후, 전기영동을 통해 gel을 확인해본 결과, P.C에서는 증폭산물로 보이는 Band가 확인되었지만, NTC조건에선 확인되지 않음(그림 11).

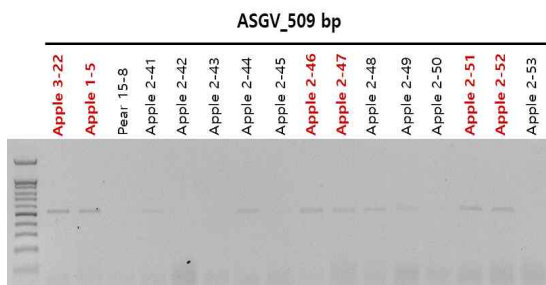


<그림 10> ACLSV exo RPA

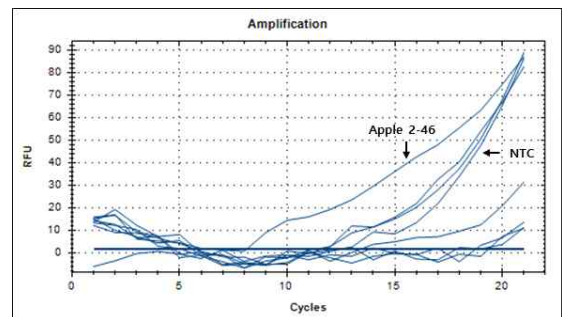


<그림 11> ACLSV exo RPA product 전기영동

- 사과시료에서 ACLSV-509 bp 진단 프라이머를 통해 ACLSV 감염시료를 추가로 확보함(그림 12).
- ACLSV 감염이 확인된 6개 시료(Apple 3-22, Apple 1-5, Apple 2-46, Apple 2-47, Apple 2-51, Apple 2-52)를 추가로 포함하여 exo RPA를 진행하였음. Incubation 조건은 39 °C에서 1 분간 20 cycle로 진행하였음(그림 13).
- ☞ 감염시료에서 증폭이 확인되지 않음. NTC조건에서 비특이적인 증폭이 확인됨.



<그림 12> ACLSV 감염시료 확보



<그림 13> ACLSV exo RPA

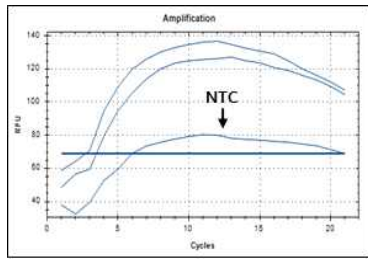
Table 2. ASGV에 대한 exo RPA 프라이머 및 프로브 서열

프라이머 프로브 이름	염기서열 5'-3'	증폭 크기(bp)
ASGV1	258F CCAATATCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTTGTA 465R CACCATACCTATATTTATCTTTCCCATCAATTATG 351P GAAAATAAAGTTAATAGTTTTCTCAAGATGCATTC	208
ASGV2	264F TCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTTGACATATG 387R TATCCAAAGTCTTCTATCTTCCTTTAAGTCAGTT 299P CTGAATGCATCTTGAGAAAACCTATTAACCTTTATTT	124

	5610F	TCTCAGCTAGAATTGAAAGATTTGGAAAAA	
ASGV3	6007R	GACAAGTCGATTCTCCAAATTTTTGTTTTT	398
	5825P	ATTTGGTAATATTGCTGTTTTTCGGGTCATCTGATA	

- ASGV가 단독감염된 배시료와 ASGV, ACLSV가 복합감염된 사과시료를 3가지의 ASGV 특이적 프라이머 및 프로브셋을 사용하여 각각 exo RPA를 통해 증폭여부를 실험함. Incubation 조건은 39 °C에서 1 분간 20 cycle로 진행하였음.

☞ 3 개의 프라이머로 실험을 진행한 각각의 감염시료와 NTC조건 모두에서 증폭이 확인되지 않음(그림 14, 그림 15, 그림 16).

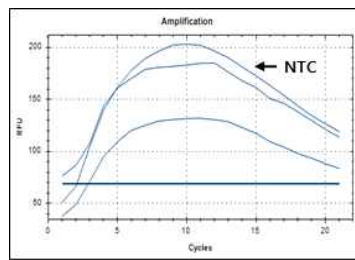


ASGV1 (208 bp)

Apple_7-6
Pear_13-11
NTC

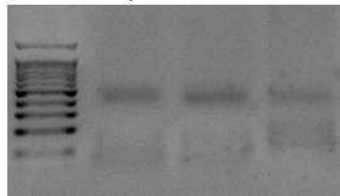


<그림 14> ASGV 프라이머1
exo RPA

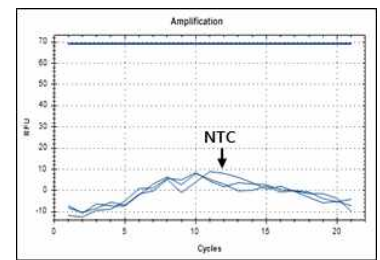


ASGV2 (124 bp)

Apple_7-6
Pear_13-11
NTC

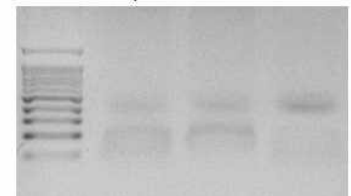


<그림 15> ASGV 프라이머2
exo RPA



ASGV3 (398 bp)

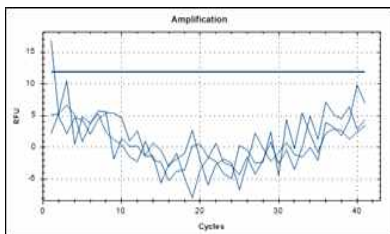
Apple_7-6
Pear_13-11
NTC



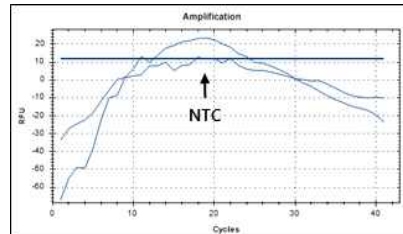
<그림 16> ASGV 프라이머3
exo RPA

- ASGV 프라이머 중 정상적인 증폭곡선이 아닌 프라이머3을 제외한 ASGV 프라이머1과 프라이머2, ACLSV 프라이머를 ASGV와 ACLSV가 복합감염된 사과시료를 사용하여 exo RPA를 진행함. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음.

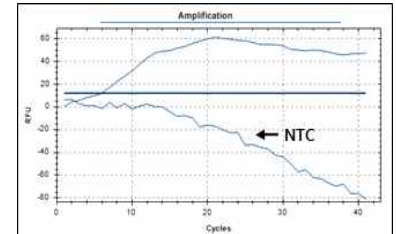
☞ 모든 조건의 시료에서 증폭이 확인되지 않음 (그림 17, 18, 19).



<그림 17> ACLSV 프라이머
exo RPA



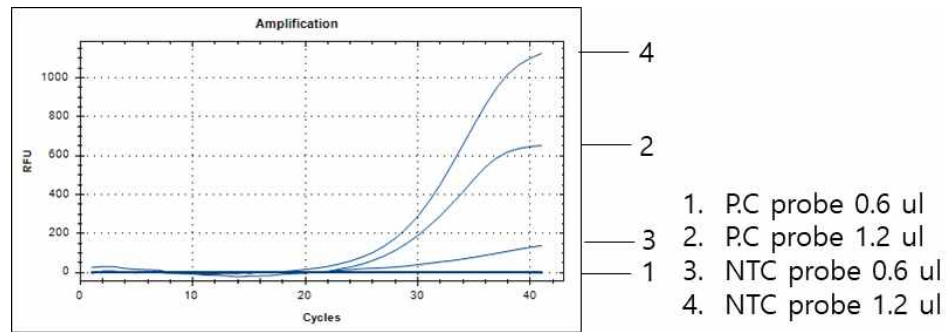
<그림 18> ASGV 프라이머1
exo RPA



<그림 19> ASGV 프라이머2
exo RPA

- 이전의 실험들과 달리 시약조성에서 프로브 농도에 차이를 주어 시료를 비교하기 위해 ACLSV 감염시료와 ACLSV 프라이머 및 프로브를 사용하여 exo RPA를 수행함. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음.

제대로 된 증폭이 확인되지 않음. NTC조건에서도 비 특이적인 증폭이 확인됨(그림 20).



<그림 20> ACLSV 감염시료 프로브 농도별 exo RPA

[별첨 1]

▶ Filter paper를 통한 핵산 추출 방법

: “Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds”
논문의 protocol 대로 수행함.

* Extraction buffer: 800 mM guanidine hydrochloride, 50 mM Tris [pH 8], 0.5% Triton X100, 1% Tween-20

* wash buffer: 10 mM Tris [pH 8.0], 0.1% Tween-20

1. Whatman No.1 filter paper를 가로 세로 3mm로 잘라준다.
1. 액체질소로 갈아준 식물 조직 5-10 mg를 1.5 ml tube에 옮겨준다.
1. 50 ul의 extraction buffer를 식물 조직이 있는 1.5 ml tube에 분주한 후, plastic pestle로 30초 동안 갈아준다.
1. 추출 버퍼에 갈아준 식물 조직에 filter paper disc를 넣고 상온에서 1분간 반응한다.
1. 새로운 tube에 200 ul의 wash buffer를 분주한다. (2번 반복이므로 2개를 준비)
1. 1분이 지난 filter paper disc를 tip를 사용하여 200 ul의 wash buffe에 옮기고 1분간 반응한다. (2번 반복)
1. 2번의 wash 과정이 끝나면 filter paper disc를 현장 진단용 실험에 template 으로 사용하면 된다.

1. Ribgrass mosaic virus (RMV) - RPA probe 진단제 개발

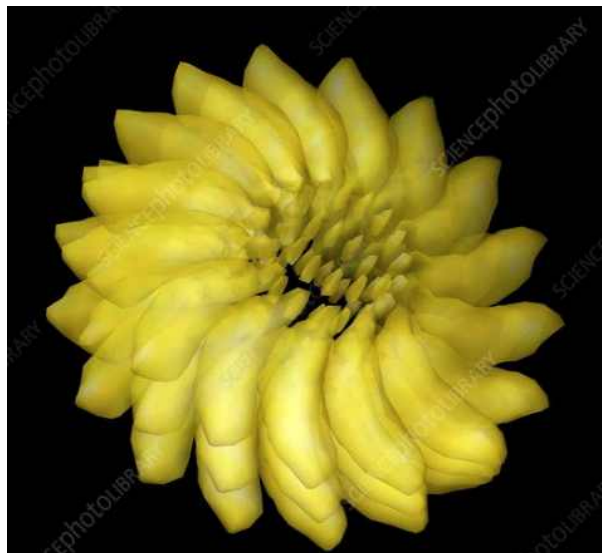
■ 주관연구기관- (주) 엘씨엠사이언스 연구결과

- Ribgrass 모자이크 바이러스(RMV)는 Tobamovirus의 한 종류입니다. 막대 모양의 입자를 가진 RNA 함유 바이러스입니다. 그것은 많은 야생 식물 중에서 찾을 수 있습니다. 이 바이러스는 그 자체로 심각한 전염병을 일으키지는 않지만, 담배에서 괴사 바이러스 질병의 선동 병원체 역할을 했습니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Ribgrass_mosaic_virus).

	Percentage				
	A	G	C	T	U
Ribgrass mosaic virus	29.3	25.8	18.0	0.0	27.0



Ribgrass mosaic virus.



<그림 1-1> GC content, Symptom, model of RMV.

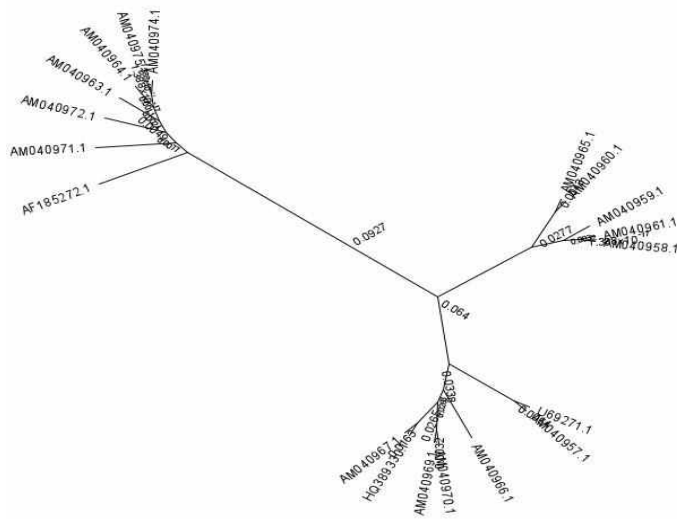


<그림 1-2> Distribution of RMV in the world.

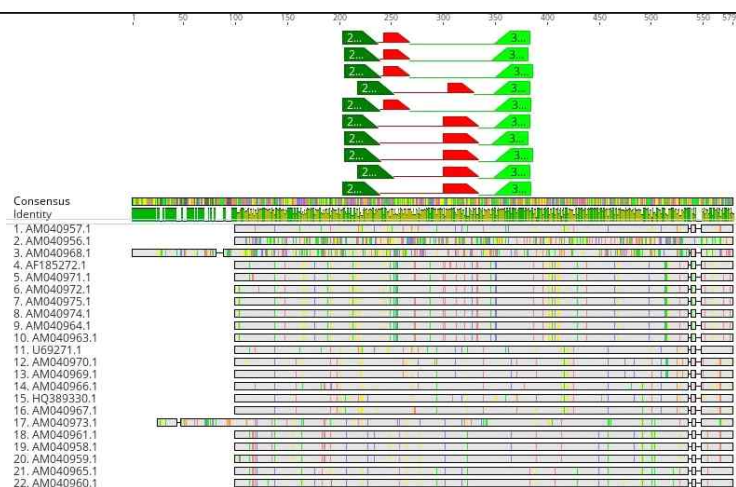
1) RMV2-CP에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인

AF185272.1	AM040971.1	AM040972.1	AM040975.1	AM040974.1	AM040964.1	AM040963.1	AM040961.1	AM040958.1	AM040959.1	AM040965.1	AM040960.1	U69271.1	AM040957.1	AM040970.1	AM040969.1	AM040966.1	HQ389330.1	AM040967.1
98.9%	98.1%	98.5%	98.5%	98.5%	98.3%	85.0%	85.0%	84.4%	86.7%	86.3%	84.4%	83.5%	83.5%	84.0%	83.8%	83.3%	85.2%	
98.9%	98.7%	99.2%	99.2%	99.2%	98.9%	84.8%	84.8%	84.2%	86.5%	86.1%	83.8%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.6%	
98.1%	98.7%	99.6%	99.6%	99.6%	99.4%	84.0%	84.0%	84.2%	85.7%	85.2%	83.3%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.2%	
98.5%	99.2%	99.6%	100%	100%	99.8%	84.0%	84.0%	84.2%	85.7%	85.2%	83.3%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.6%	
98.5%	99.2%	99.6%	100%	100%	99.8%	84.0%	84.0%	84.2%	85.7%	85.2%	83.3%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.6%	
98.5%	99.2%	99.6%	100%	100%	99.8%	84.0%	84.0%	84.2%	85.7%	85.2%	83.3%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.6%	
98.3%	98.9%	99.4%	99.8%	99.8%	99.8%	84.0%	84.0%	84.2%	85.7%	85.2%	83.3%	82.9%	82.9%	83.3%	83.1%	83.1%	84.6%	
85.0%	84.8%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	100%	100%	99.4%	95.4%	94.5%	89.0%	88.6%	88.4%	88.8%	89.2%	88.4%	89.0%	
85.0%	84.8%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	100%	100%	99.4%	95.4%	94.5%	89.0%	88.6%	88.4%	88.8%	89.2%	88.4%	89.0%	
84.4%	84.2%	84.2%	84.2%	84.2%	84.2%	99.4%	99.4%	94.7%	93.9%	93.9%	88.4%	88.0%	87.8%	88.2%	88.6%	88.4%	88.4%	
86.7%	86.5%	85.7%	85.7%	85.7%	85.7%	95.4%	95.4%	94.7%	92.2%	92.2%	89.9%	89.0%	87.3%	87.8%	88.8%	88.8%	89.7%	
86.3%	86.1%	85.2%	85.2%	85.2%	85.2%	94.5%	94.5%	93.9%	92.2%	92.2%	89.0%	88.2%	86.5%	86.9%	88.4%	88.0%	88.8%	
84.4%	83.8%	83.3%	83.3%	83.3%	83.3%	89.0%	89.0%	88.4%	89.9%	89.0%	98.7%	98.7%	92.6%	93.2%	92.8%	93.2%	93.9%	
83.5%	82.9%	82.9%	82.9%	82.9%	82.9%	88.6%	88.6%	88.0%	89.0%	88.2%	98.7%	98.7%	93.5%	94.1%	93.7%	94.1%	94.7%	
83.5%	82.9%	82.9%	82.9%	82.9%	82.9%	88.4%	88.4%	87.8%	87.3%	86.5%	92.6%	93.5%	99.4%	94.5%	94.1%	95.4%	95.8%	
84.0%	83.3%	83.3%	83.3%	83.3%	83.3%	88.8%	88.8%	88.2%	87.8%	86.9%	93.2%	94.1%	99.4%	95.1%	95.1%	95.8%	96.0%	
83.8%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	89.2%	89.2%	88.6%	88.8%	88.4%	92.8%	93.7%	94.5%	95.1%	95.1%	95.8%	96.0%	
83.3%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	83.1%	88.4%	88.4%	87.8%	88.8%	88.0%	93.2%	94.1%	94.5%	93.9%	93.9%	95.8%	96.8%	
85.2%	84.6%	84.2%	84.6%	84.6%	84.6%	89.0%	89.0%	88.4%	89.7%	88.8%	93.9%	94.7%	95.4%	95.8%	96.0%	96.8%	96.8%	

<그림 1-3> Comparison the homology of RMV-CP genes.



<그림 1-4> Phylogenic tree of RMV-CP genes.



<그림 1-5> Region of primer and probe of RMV-CP genes.

1. RMV2-CP-134F:

5'-TTAGAXXXAATTCTCAAACCTTXXXXGTGCGATT -3'

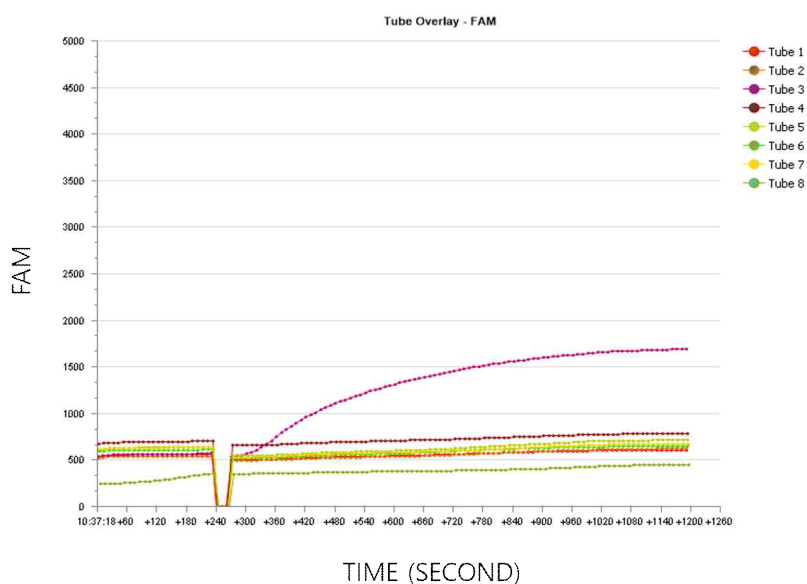
2. RMV2-CP-205P:

5'- CAG XXX GAA XXX ACA XXX GGG TAC CGG GTG [FAM-dT] A [THF] G [BHQ1-dT]
TAA XXX GGC XXX TAT -3' Spacer C

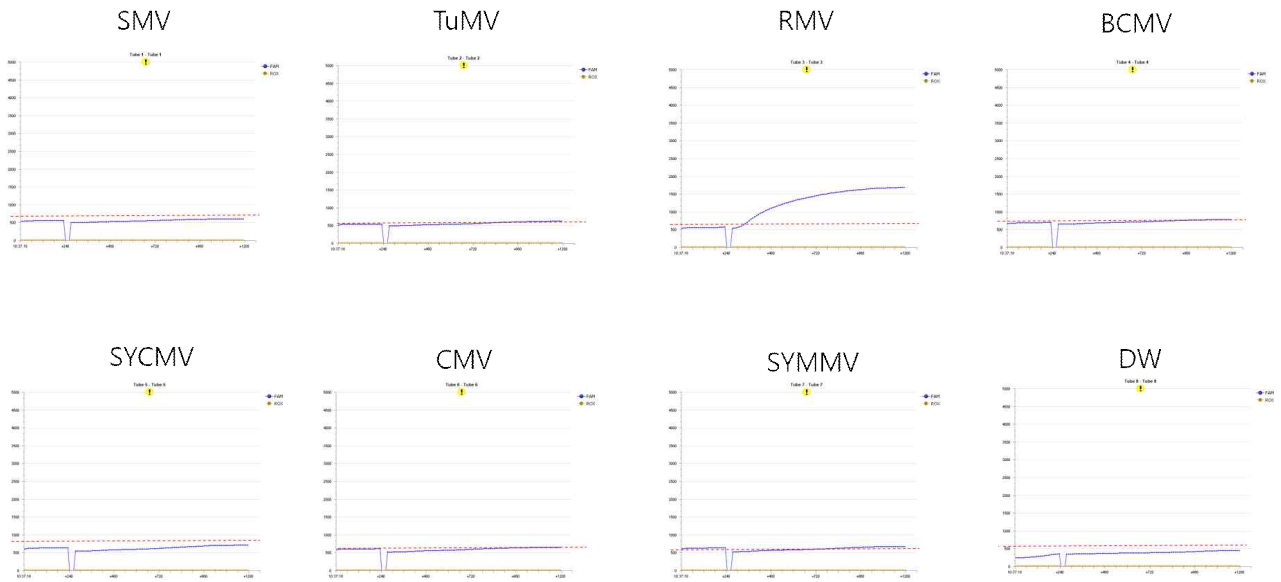
3. RMV2-CP-284R:

5'- XXXATCCTATXXXTAGTATCAXXXXCTTCATAAG -3'

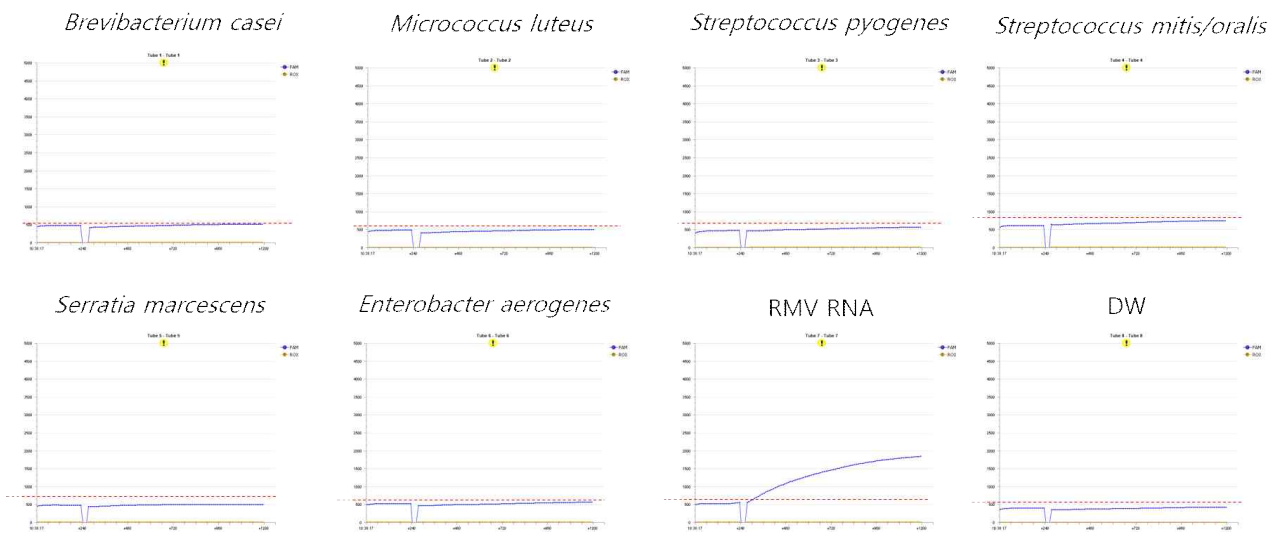
<그림 1-6> Candidate of primer and probe set of RMV-CP genes.

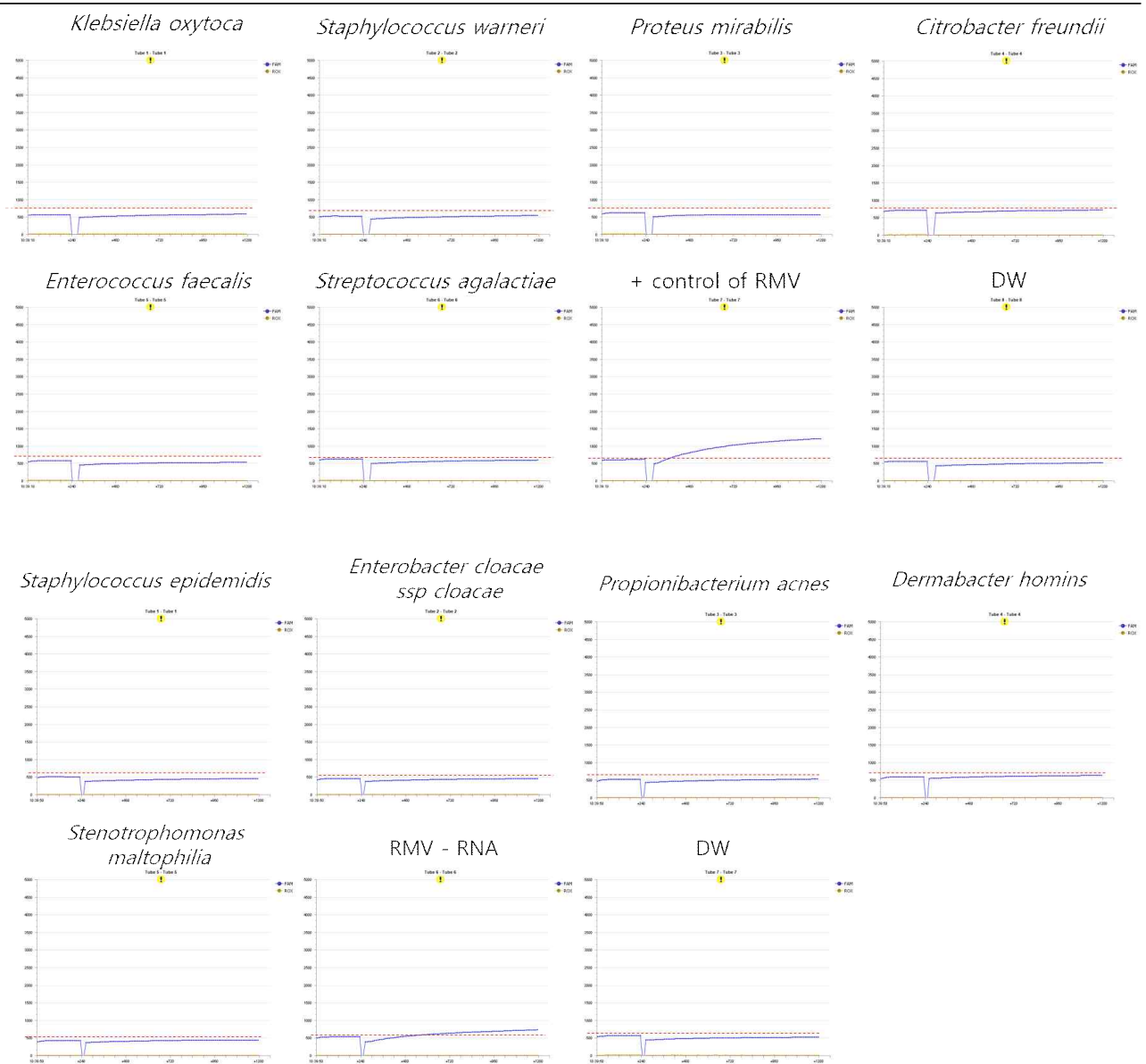


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
RMV2-CP-134F	0.7 ul
RMV2-CP-284R	0.7 ul
RMV2-CP-205P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-7> Reaction composition of RPA and specificity of RMV2-CP primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).





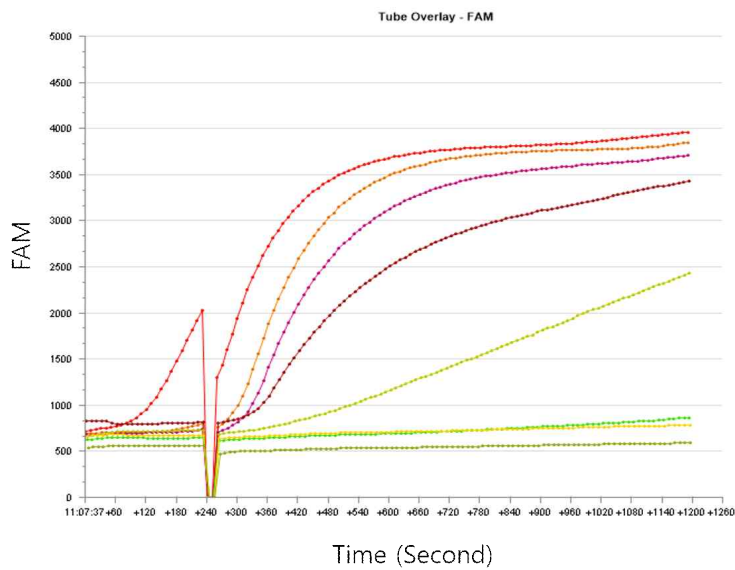
<그림 1-8> Specificity of RMV2-CP primer and probe against the several genome of bacteria.

```

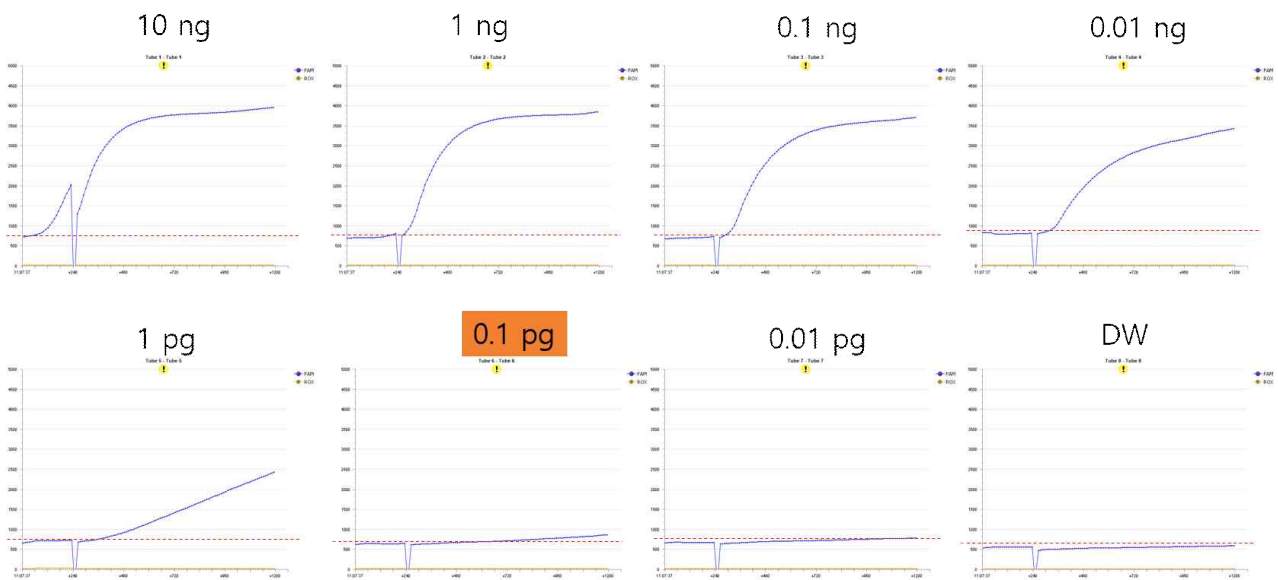
ATACTGTTAGACAGCAATTCTCAAACCTTGTTGAGTGCGATTGT
GACGXXXXXXXXCAGCGGTTCCCAGAAACAGGGTXXXXXGTGT
ATGTTAATTCGGCAGTTATAAAGCCGTTGTACGAGGCTCTTAT
GAAGTCCTXXXXXXXXAGAAATAGGATCATTGAGAC

```

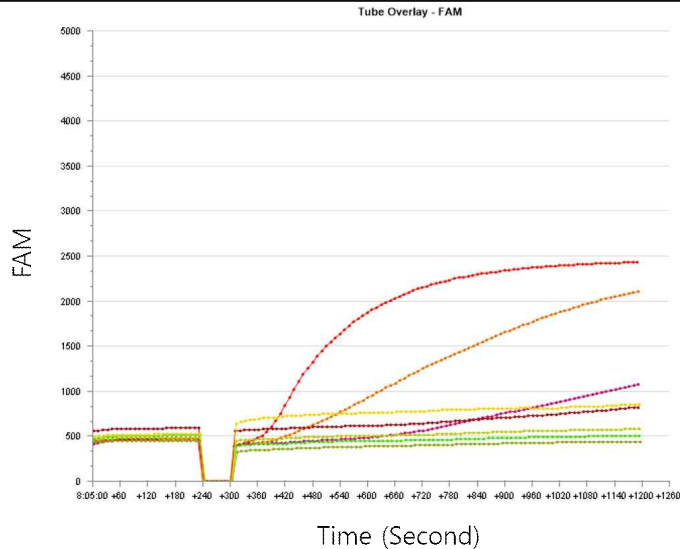
<그림 1-9> Synthetic target gene of RMV2-CP primer set.



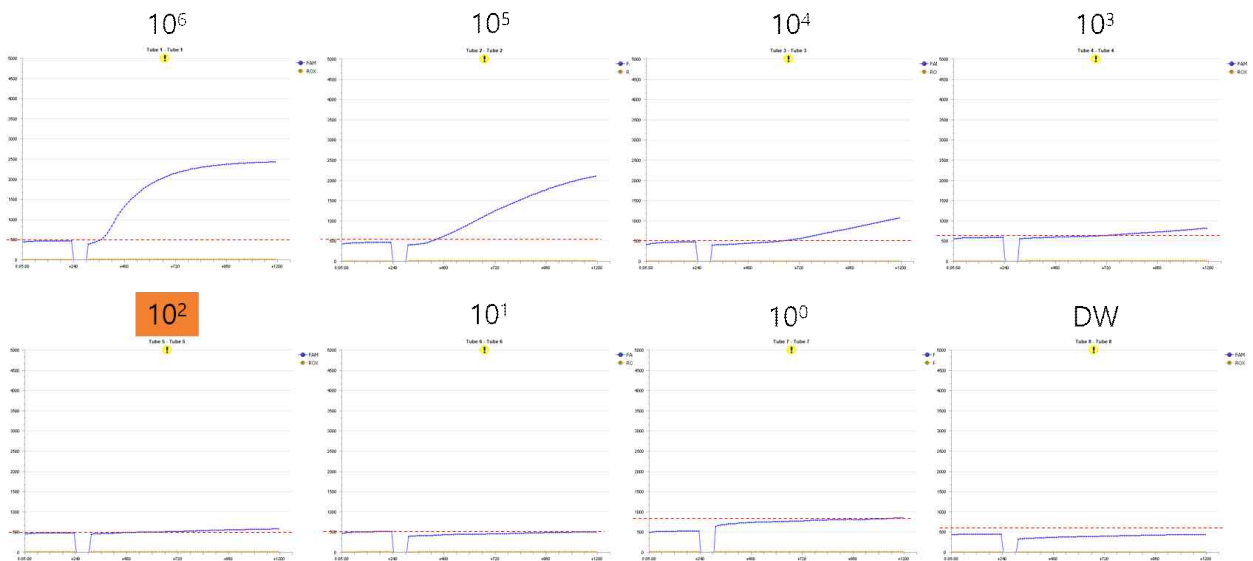
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
RMV2-CP-134F	0.7 ul
RMV2-CP-284R	0.7 ul
RMV2-CP-205P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-10> Sensitivity of RMV2-CP primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
RMV2-CP-134F	0.7 ul
RMV2-CP-284R	0.7 ul
RMV2-CP-205P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-11> Sensitivity of RMV2-CP primer and probe (copies/ul).

- RMV-CP 유전자 22건에 대한 유전자를 분석한 결과 3개의 sub type으로 나뉘었다 (그림 1-3, 4).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, coat protein gene의 중간부분에 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 그중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; RMV2-CP-134F, RMV2-CP-284R, RMV2-CP-205P)의 특성을 평가하였다 (그림 1-5, 6).
- RPA Exo kit를 사용하여 7가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, RMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-7).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-8).

- RMV2-CP primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-9).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 0.1 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-10).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 100 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-11).
- 이상의 결과로 RT-RPA RMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-12).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-13).
- RMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠싸이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-14).



<그림 1-12> RMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-RMV-ER-50

Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-RMV-ER-0001
Issue Date: Jul 24, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.vullobal.wavework.kr nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwasong-si Gyeonggi-do South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of segment RMV-CP gene to detect the RMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Ribgrass mosaic virus (RMV) is a species of Tobamovirus. It is an RNA-containing virus with rod-shape particles. It can be found in many wild plant species. This virus does not itself produce serious epidemic diseases, but it served as the inciting pathogen of a necrotic virus disease in burly tobacco.



< Distribution map of RMV >

The Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Ribgrass mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the RMV-CP gene for the unique amplification of Ribgrass mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	RMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	RMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	RMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	RMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

* Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	RMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	RMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	RMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

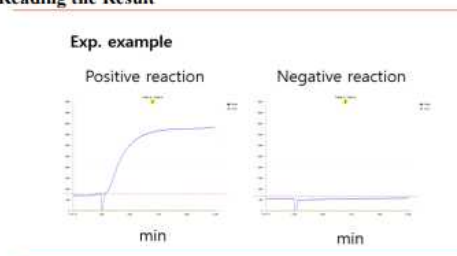
- 1) Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- 2) Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- 3) Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- 4) Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
* It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- 5) Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- 6) Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- 7) Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
- * Unknown: clinical sample
- * Negative control
- * Positive control

8. Reading the Result



<Example of RMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	RMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	RMV Positive
2	+	-	-	RMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- 1) For research use only.
- 2) Carefully read this instruction before starting the procedure.
- 3) Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- 4) Do not use the kit after its expiration date written on box.
- 5) Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- 6) Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- 7) Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- 8) Use always sterile pipette tips with filters.
- 9) Wear separate coats and gloves in each area.
- 10) Collected test samples in sterile tubes.
- 11) Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, DO FURTHER

<그림 1-13> Insert of RMV ER Detection kit.

LCM SCIENCE
2019-2020-2021

Ribgrass Mosaic Virus (RMV) ER-Detection Kit

Ribgrass mosaic virus (RMV) 리브그라스 모자이크 바이러스



1. 리브그라스 모자이크 바이러스(RMV)는 벼과에 속하는 리브그라스(Ribgrass)의 바이러스로, 벼과에 감염하여 벼과에 피해를 입히는 바이러스이다.
2. 리브그라스 모자이크 바이러스(RMV)는 벼과에 감염하여 벼과에 피해를 입히는 바이러스이다.
3. 리브그라스 모자이크 바이러스(RMV)는 벼과에 감염하여 벼과에 피해를 입히는 바이러스이다.
4. Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 RMV를 검출하는 분자진단제입니다.
5. Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection Kit는 감염된 작물로 부터 RMV를 검출하여 증장분식하는 연구용 제품입니다.

Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection Kit는
감염된 작물로 부터 RMV를 검출하여 증장분식하는 연구용 제품입니다.

LCM SCIENCE
2019-2020-2021

사용 목적

Ribgrass mosaic virus (RMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 RMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE
2019-2020-2021

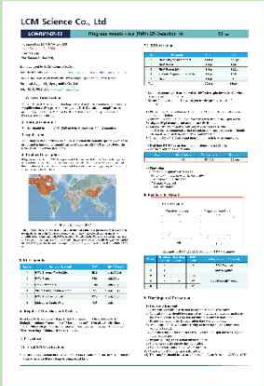
제품 스펙

검체	RMV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-RMV-ER-50	Ribgrass Mosaic Virus (RMV) ER - Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

제품설명서



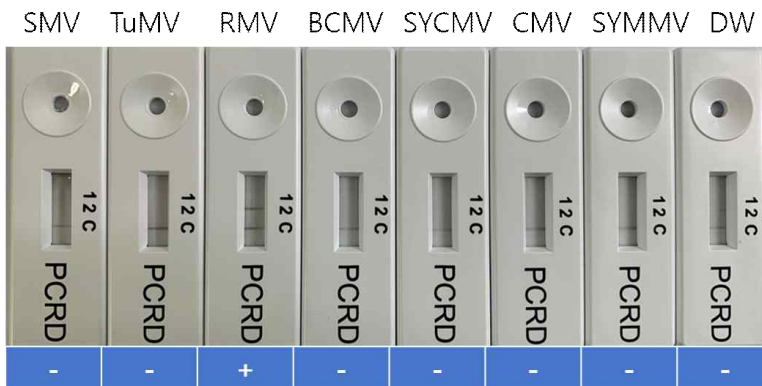
LCM SCIENCE
2019-2020-2021

<그림 1-14> Contents of RMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ RMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

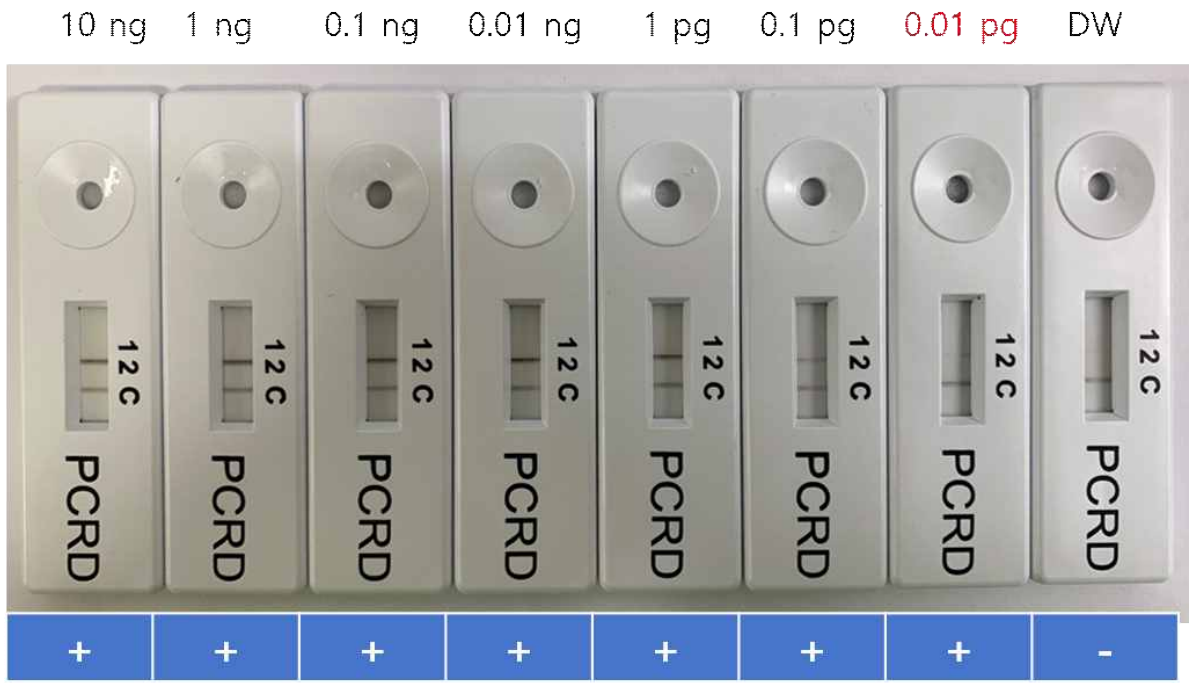
1. RMV2-CP-134F:
5'-TTAGAXXXAATTCTCAAACCTTXXXXGTGCGATT -3'
2. RMV2-CPnfo-205P:
5'- [FAM] CAG XXX TTC XXX GAA ACA XXX TAC CGG GTG T A [THF] G T
TAA XXX GGC XXX TAT -3' Spacer C
3. RMV2-CPnfo-284R:
5'- [Biotin] ATGAXXXATTTCTAXXXCAAAGGACXXXXAAG -3'

<그림 1-15> RPA nfo primer probe set of RMV.

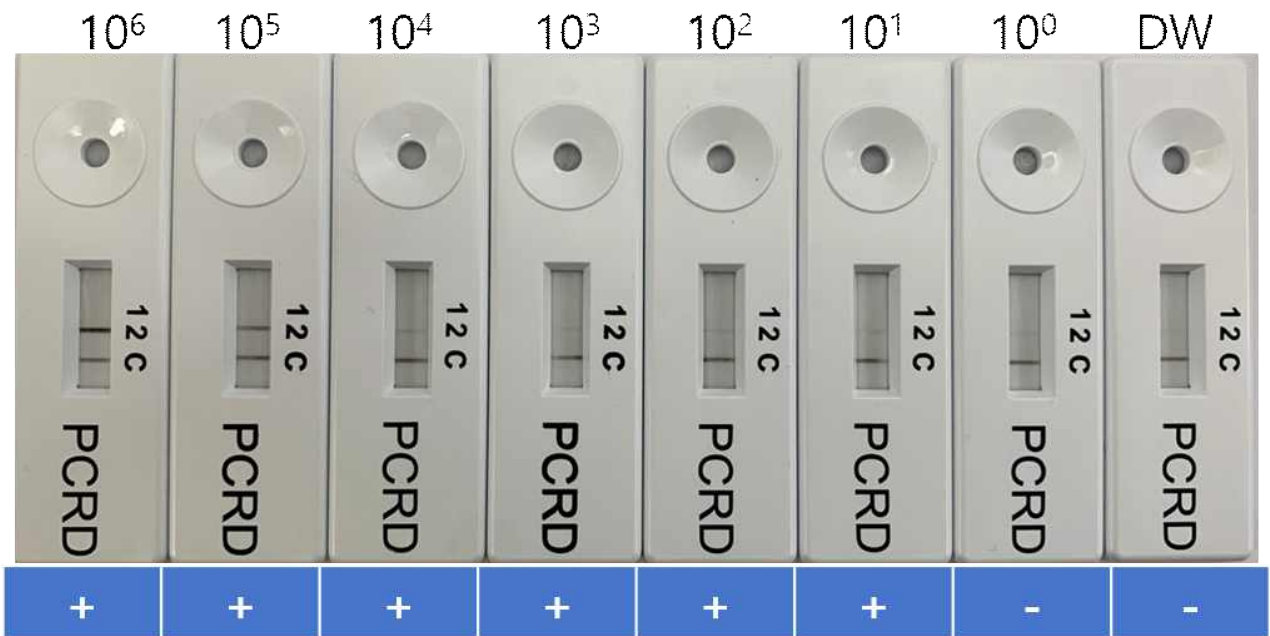


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
RMV2-CPnfo-134F	0.7 ul
RMV2-CPnfo-284R	0.7 ul
RMV2-CPnfo-205P	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-16> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of RMV2-CP primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

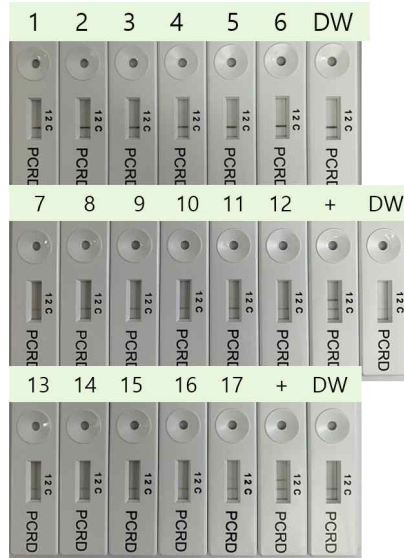


<그림 1-17> Sensitivity of RMV2-CPnfo primer and probe (concentration).



<그림 1-18> Sensitivity of RMV2-CPnfo primer and probe (copies/ul).

reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
RMV2-CPnfo-134F	0.7 ul
RMV2-CPnfo-284R	0.7 ul
RMV2-CPnfo-205P	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

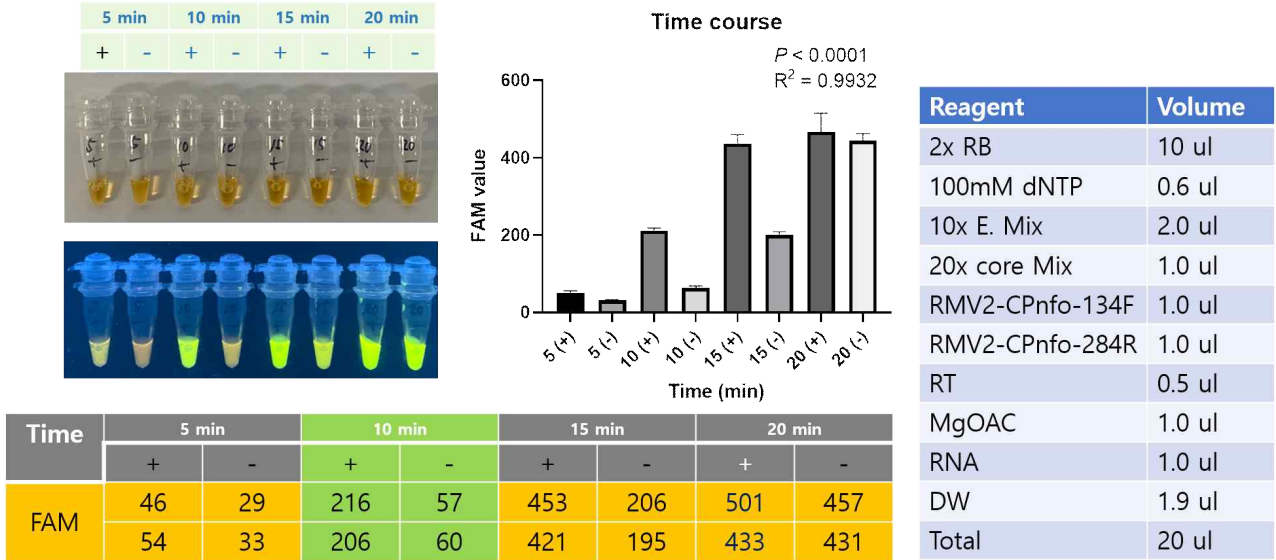


No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	RMV2-CP - mRNA transcript	Positive

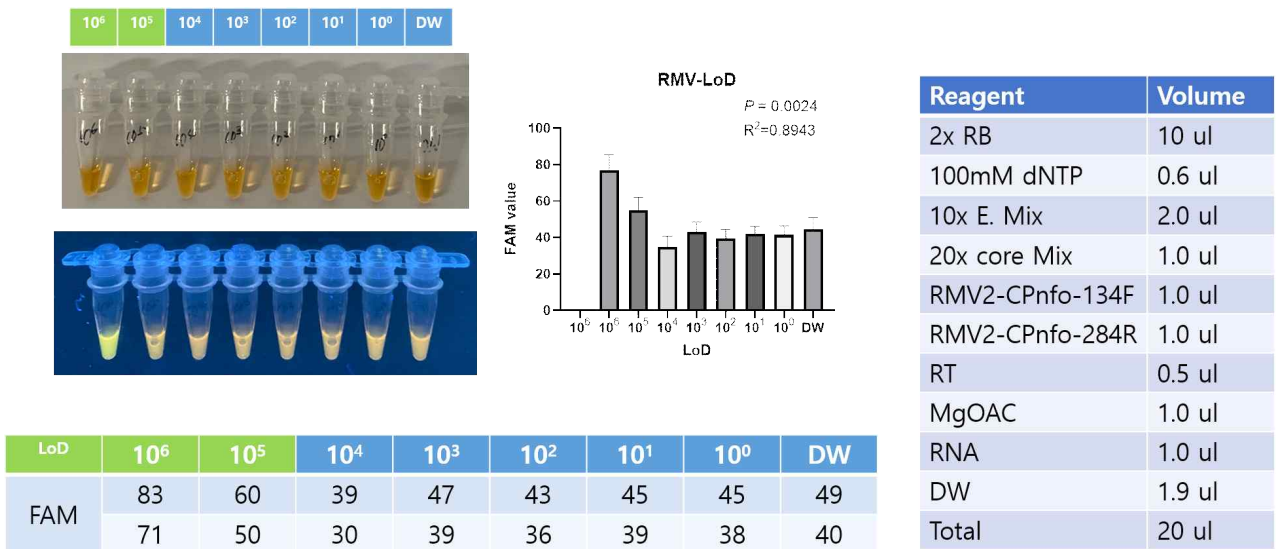
<그림 1-19> Specificity of RMV2-CP primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT RMV2-CP primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-15).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-16과 같이 nfo primer probe는 RMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.01 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-17).
- 목표유전자를 10⁶ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 10 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-18).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-19).

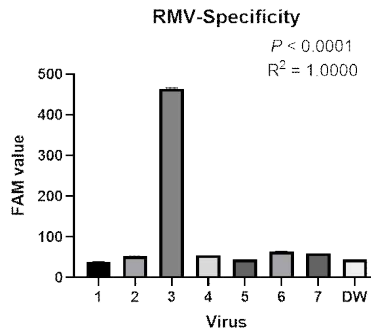
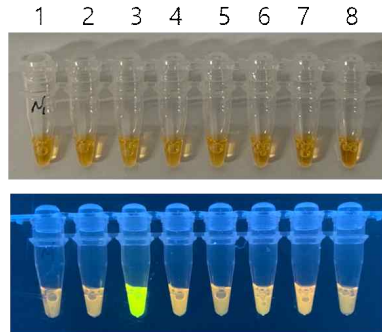
■ RMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



<그림 1-20> RPA end point reaction with primer set of RMV according to the time.



<그림 1-21> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of RMV.



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
RMV2-CPnfo-134F	1.0 ul
RMV2-CPnfo-284R	1.0 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.9 ul
Total	20 ul

No	1	2	3	4	5	6	7	8
Virus	SYCMV SYMMV (7/15/22)	TuMV (6/3/22)	RMV (6/3/22)	BCMV (4/15/22)	SMV/ SYMMV (7/15/22)	CMV (9/13/22)	TYMV (5/25/22)	DW
FAM	39 38	53 52	463 466	55	45	65 64	60	45

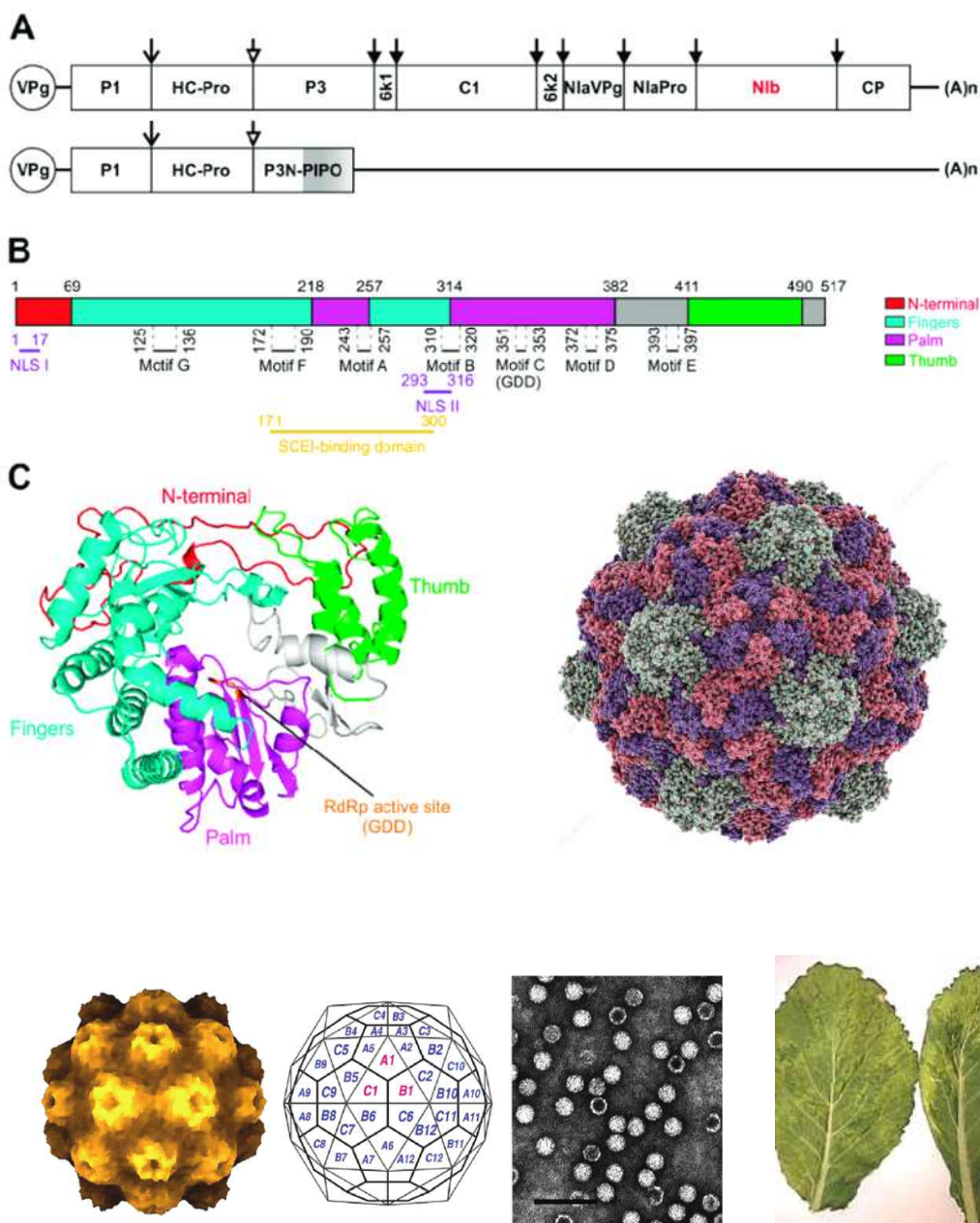
<그림 1-22> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of RMV2-CP primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT RMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39℃에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분 후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-20).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul까지 단계적 희석한 후 39℃에서 10분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10⁵ copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-21).
- 그림 1-22와 같이 nfo primer probe는 RMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

2. Turnip mosaic virus (TuMV) - RPA probe 진단제 개발

■ 주관연구기관-엘씨엠사이언스 (주) 연구결과

- 순무 모자이크 바이러스(TuMV)는 십자화과 식물 등에 질병을 일으키는 포티바이러스과의 포티바이러스입니다. 이 바이러스는 일반적으로 40~50종의 진딧물에 의해 지속적이지 않은 방식으로 퍼집니다. 감염된 식물, 특히 자연 숙주는 백화성 국소 병변, 모자이크, 반점, 주름 또는 주름과 같은 증상을 보입니다. TuMV는 포지티브 센스 단일 가닥 RNA 바이러스로, 평균 길이가 720nm인 필라멘트 모양의 유연한 나선형 캡시드로 구성되어 있습니다. TuMV 계놈은 선형 및 단일 입자(단일 입자)입니다. 바이러스의 열 불활성화점(TIP)은 62°C이고 시험관 내 수명(LIV)은 3~4일입니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Turnip_mosaic_virus).

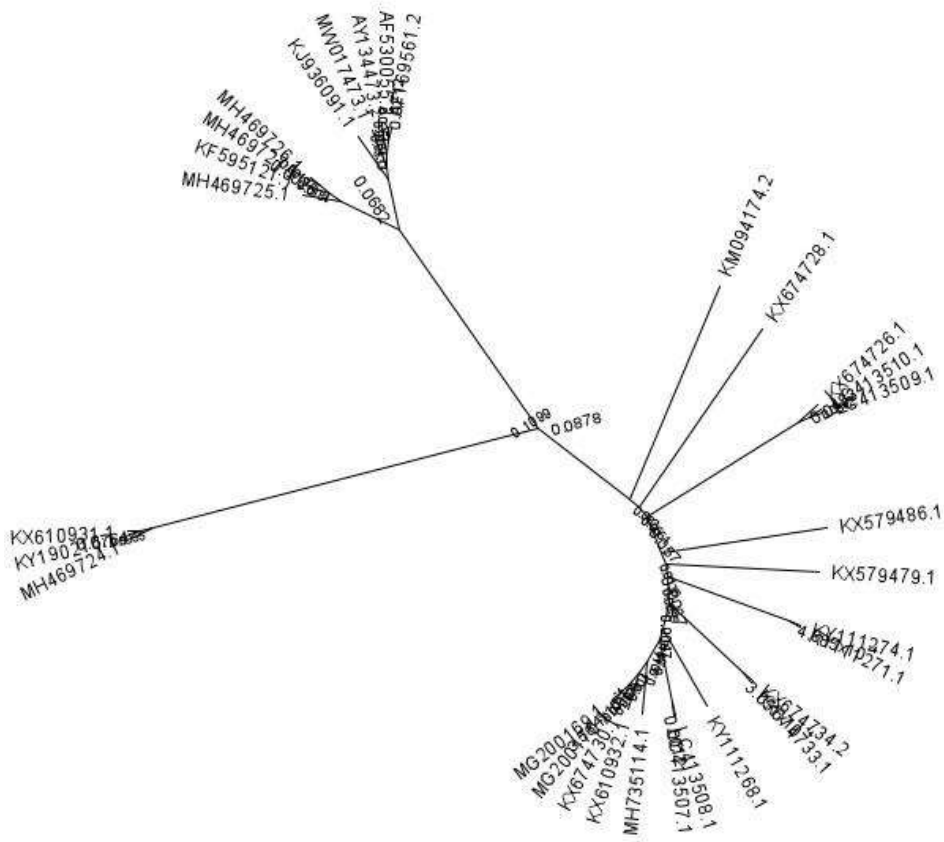


<그림 1-23> Genetic map, Symptom, model of TuMV.

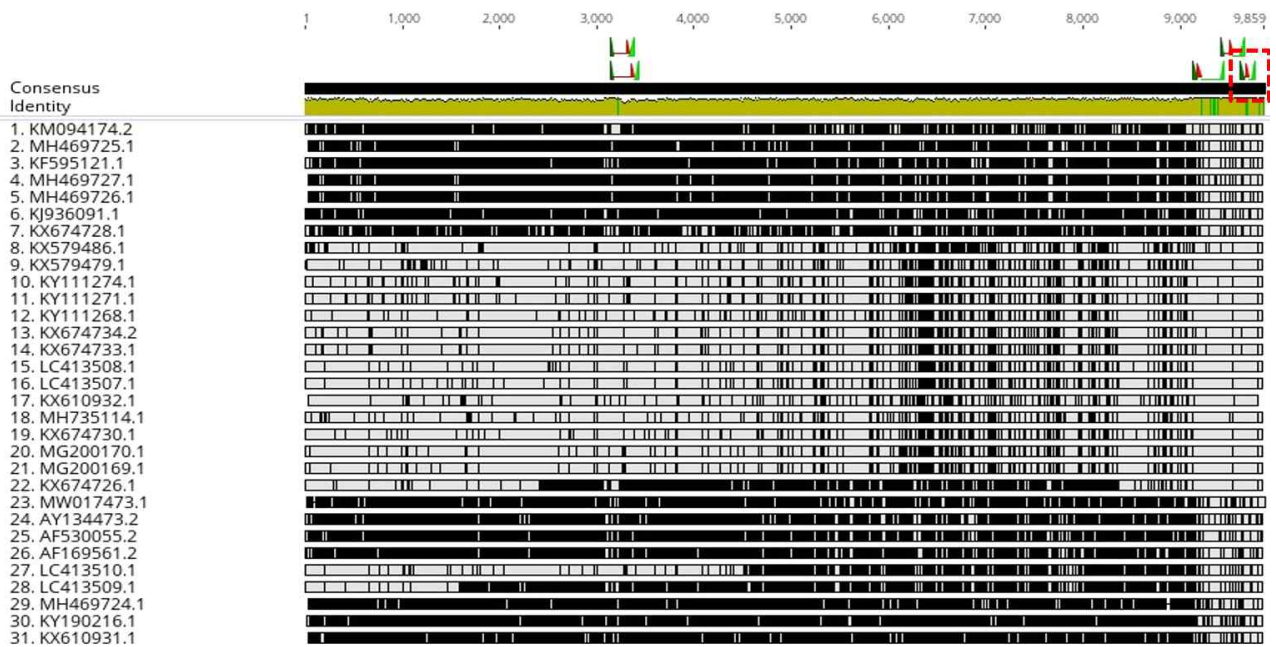
1) TuMV에 대한 유전자 분석 및 프라이머 프로브 디자인

	KM0941_	MH4697_	KF59512_	MH4697_	KJ93699_	KX67472_	KX57948_	KX57947_	KY11227_	KY11227_	KY11226_	KX67473_	KX67473_	LC41350_	LC41350_	KX610932_	MH7351_	KX67473_	MG2001_	MG2001_	KX67472_	MW017_	AY13447_	AF53005_	AF16956_	LC41351_	LC41350_	MH4697_	KY19021_	KX610931_	
KM0941742	84.1%	83.9%	83.8%	83.9%	84.2%	85.1%	86.1%	85.5%	85.7%	85.8%	85.8%	85.7%	85.8%	85.7%	85.8%	85.8%	85.7%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	85.8%	
MH469725.1	84.1%	96.5%	96.4%	96.5%	86.5%	86.4%	84.2%	84.2%	84.3%	84.3%	84.2%	84.2%	84.2%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	
KF59512.1	83.9%	96.5%	99.4%	99.6%	86.4%	86.3%	84.0%	83.9%	84.2%	84.2%	84.1%	84.0%	84.0%	84.2%	84.1%	84.1%	84.1%	84.2%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	
MH469727.1	83.8%	96.4%	99.4%	99.6%	86.4%	86.3%	84.1%	84.0%	84.2%	84.2%	84.0%	84.0%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	
MH469725.1	83.9%	96.5%	99.6%	99.6%	86.5%	86.4%	84.1%	84.0%	84.1%	84.1%	84.0%	83.9%	84.0%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	84.1%	
KJ93699.1	84.2%	86.5%	86.4%	86.4%	86.5%	86.7%	83.3%	83.4%	83.6%	83.6%	83.6%	83.5%	83.5%	83.6%	83.5%	83.5%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	83.6%	83.7%	
KX674728.1	85.1%	86.4%	86.3%	86.3%	86.4%	86.7%	87.9%	87.7%	87.8%	87.9%	88.0%	87.8%	87.8%	88.0%	87.9%	88.1%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	88.0%	
KX579486.1	86.1%	84.2%	84.0%	84.1%	84.1%	83.3%	87.9%	97.4%	97.2%	97.2%	97.3%	97.3%	97.3%	97.4%	97.3%	97.6%	97.4%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	
KX579479.1	85.5%	84.2%	83.9%	84.0%	84.0%	83.3%	87.7%	97.4%	97.2%	97.2%	97.3%	97.3%	97.3%	97.4%	97.3%	97.6%	97.4%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	
KY112274.1	85.7%	84.3%	84.2%	84.2%	84.1%	83.6%	87.8%	97.2%	98.5%	98.5%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	
KY112271.1	85.8%	84.3%	84.2%	84.2%	84.1%	83.6%	87.9%	97.2%	98.5%	98.5%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
KY112268.1	85.8%	84.2%	84.1%	84.0%	84.0%	83.6%	88.0%	97.3%	98.6%	98.6%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
KX674734.2	85.7%	84.2%	84.0%	84.0%	83.9%	83.5%	87.8%	97.3%	98.6%	98.6%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
KX674733.1	85.8%	84.2%	84.0%	84.0%	84.0%	83.5%	87.8%	97.3%	98.6%	98.6%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
LC413508.1	85.8%	84.3%	84.2%	84.1%	84.1%	83.6%	88.0%	97.4%	98.6%	98.6%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
LC413507.1	85.7%	84.3%	84.1%	84.1%	84.1%	83.5%	87.9%	97.3%	98.5%	98.5%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	98.8%	
KX610932.1	85.8%	84.3%	84.1%	84.1%	84.1%	83.6%	88.1%	97.6%	98.8%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
MH735114.1	85.8%	84.3%	84.2%	84.1%	84.1%	83.7%	88.0%	97.4%	98.7%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
KX674730.1	85.8%	84.3%	84.1%	84.1%	84.1%	83.6%	88.0%	97.5%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
MG200170.1	85.8%	84.3%	84.1%	84.1%	84.1%	83.7%	88.0%	97.5%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
MG200169.1	85.8%	84.3%	84.1%	84.1%	84.1%	83.7%	88.0%	97.5%	98.8%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	98.9%	
KX674726.1	88.5%	85.6%	85.6%	85.6%	85.7%	86.8%	88.7%	89.4%	89.8%	90.1%	90.1%	90.2%	90.1%	90.1%	90.0%	90.0%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	90.2%	
MW017473.1	84.6%	88.2%	87.7%	87.9%	88.0%	90.0%	87.7%	83.8%	83.8%	84.0%	84.0%	83.9%	83.8%	83.8%	84.0%	84.1%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%
AY134473.2	84.7%	87.9%	87.9%	87.9%	88.0%	89.9%	87.9%	83.9%	84.1%	84.4%	84.4%	84.3%	84.2%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%
AF530055.2	84.7%	88.4%	88.2%	88.2%	88.2%	89.9%	87.9%	83.7%	83.8%	84.0%	84.0%	83.9%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.0%	84.1%	87.3%	94.2%	94.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	
AF169561.2	85.0%	89.0%	88.9%	88.9%	89.0%	91.1%	88.1%	84.0%	84.1%	84.4%	84.4%	84.3%	84.2%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.3%	84.4%	84.4%	87.9%	95.3%	95.5%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%
LC413510.1	84.5%	86.5%	86.6%	86.4%	86.6%	88.0%	91.2%	91.8%	91.9%	92.2%	92.2%	92.3%	92.2%	92.2%	92.7%	92.4%	92.3%	92.3%	92.4%	92.4%	91.9%	92.2%	92.4%	92.9%	92.9%	92.9%	92.9%	92.9%	92.9%	92.9%	
LC413509.1	84.0%	87.1%	87.0%	86.9%	87.0%	89.0%	88.8%	86.3%	86.4%	86.8%	86.8%	86.8%	86.7%	86.7%	87.1%	87.0%	86.8%	86.9%	86.9%	86.9%	86.9%	90.3%	92.7%	92.3%	91.9%	92.9%	93.5%	93.5%	93.5%	93.5%	
MH469724.1	81.1%	80.9%	80.9%	81.0%	81.0%	82.8%	81.0%	81.9%	81.5%	81.6%	81.6%	81.7%	81.6%	81.7%	81.7%	81.7%	81.7%	81.7%	81.7%	81.7%	81.7%	81.3%	80.8%	80.9%	80.8%	81.3%	80.7%	80.4%	83.8%	83.7%	
KY190216.1	81.4%	80.9%	81.0%	81.0%	81.1%	84.2%	81.0%	81.1%	80.9%	81.2%	81.2%	81.2%	81.1%	81.2%	81.2%	81.1%	81.2%	81.2%	81.2%	81.2%	81.2%	81.3%	81.0%	80.8%	81.1%	81.3%	81.0%	80.7%	80.4%	83.8%	83.7%
KX610931.1	81.8%	82.7%	82.8%	82.7%	82.8%	85.2%	82.6%	81.7%	81.3%	81.5%	81.6%	81.6%	81.5%	81.5%	81.6%	81.6%	81.7%	81.6%	81.6%	81.6%	81.7%	82.1%	82.6%	82.7%	82.7%	83.1%	82.8%	82.4%	83.7%	86.7%	86.7%

<그림 1-24> Comparison the homology of TuMV genes.



<그림 1-25> Phylogenetic tree of TuMV genes.



<그림 1-26> Region of primer and probe of TuMV genes.

1. TuMV2-9,622 F:

5'- ATGAXXXGTATGCTAXXXXXXTATAAGTAGTTAA -3'

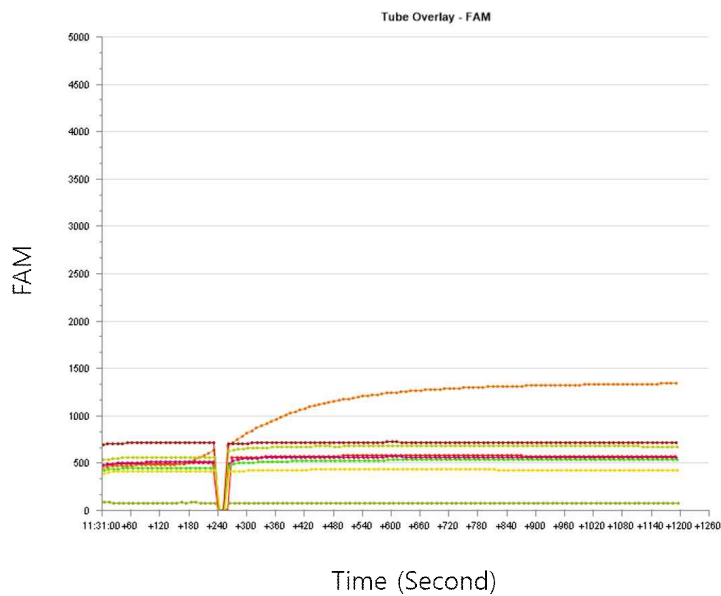
2. TuMV2- 9,670 P:

5'- TTA XXX GTT AGT XXX CTC GCT XXX GGG AAA [FAM-dT] A [THF] G
 [BHQ1-dT] AAG XXX GTT AAA XXX -3' Spacer C

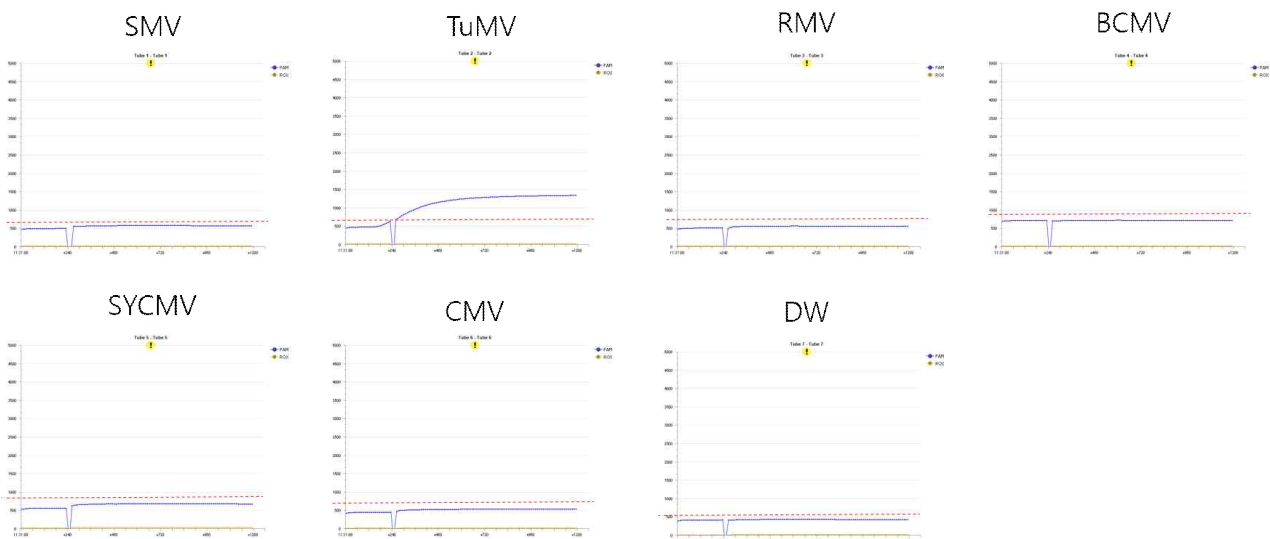
3. TuMV2- 9,770 R:

5'- AATAXXXTCGGCGAAAAXXXXXAAGTAACAA -3'

<그림 1-27> Candidate of primer and probe set of TuMV genes.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TuMV2-9,622 F	0.7 ul
TuMV2- 9,770 R	0.7 ul
TuMV2- 9,670 P(0.5 pM)	0.2 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

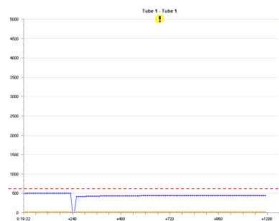


<그림 1-28> Reaction composition of RPA and specificity of TuMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

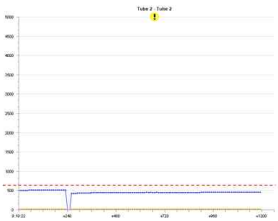
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TuMV2-9,622 F	0.7 ul
TuMV2- 9,770 R	0.7 ul
TuMV2- 9,670 P (0.5 pM)	0.2 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	TuMV - mRNA transcript	Positive

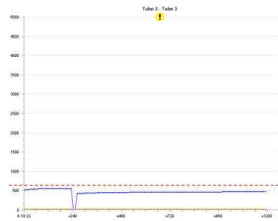
Brevibacterium casei



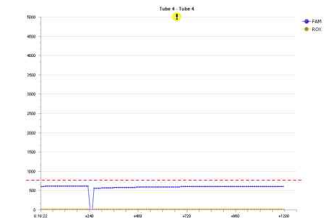
Micrococcus luteus



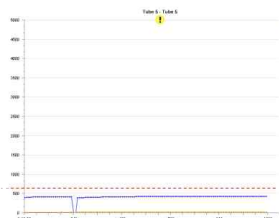
Streptococcus pyogenes



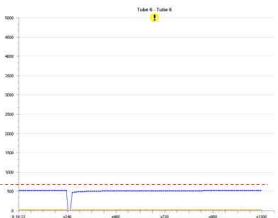
Streptococcus mitis/oralis



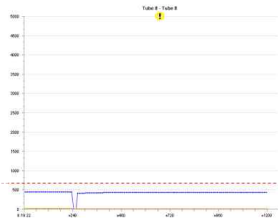
Serratia marcescens

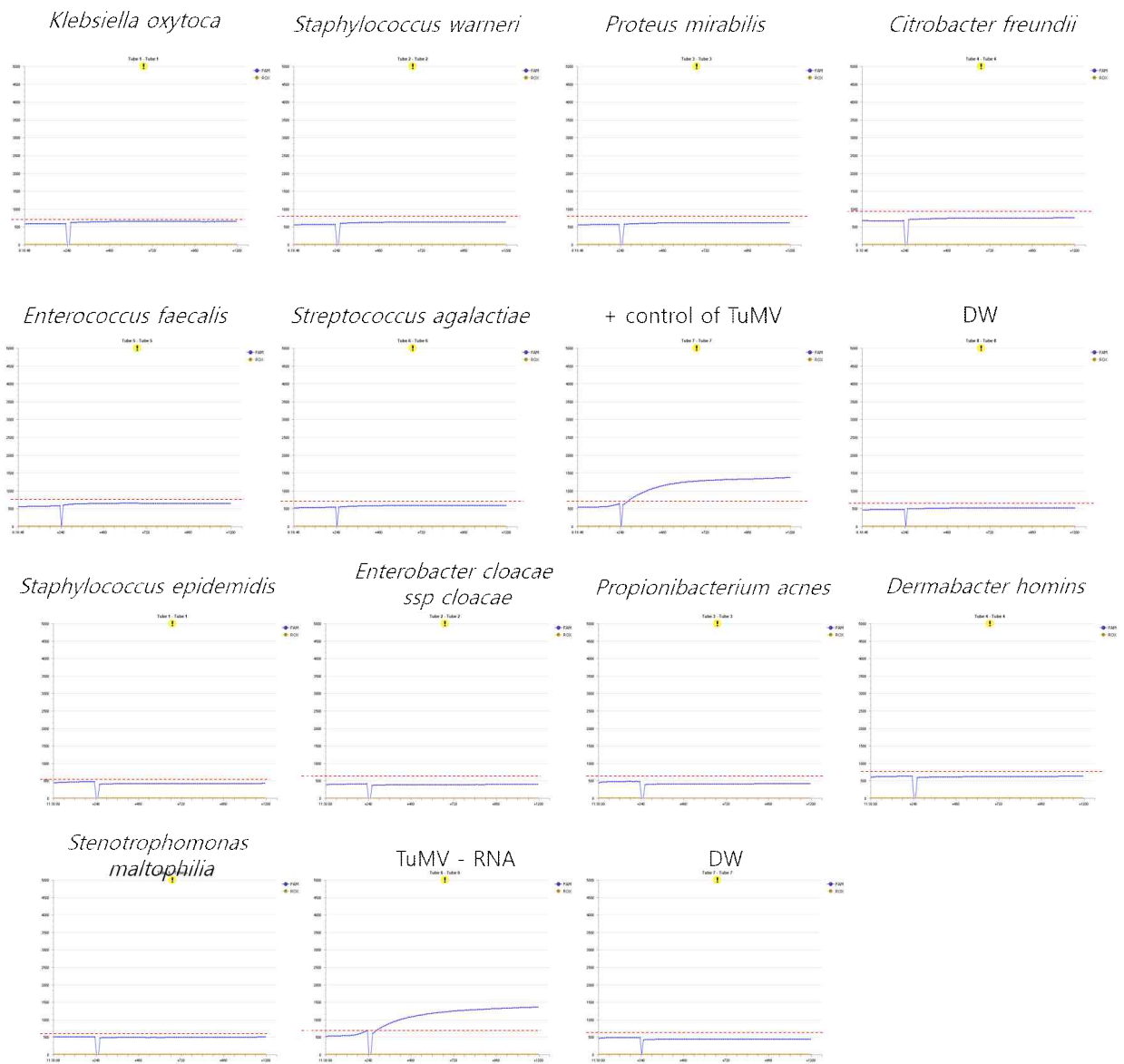


Enterobacter aerogenes



DW





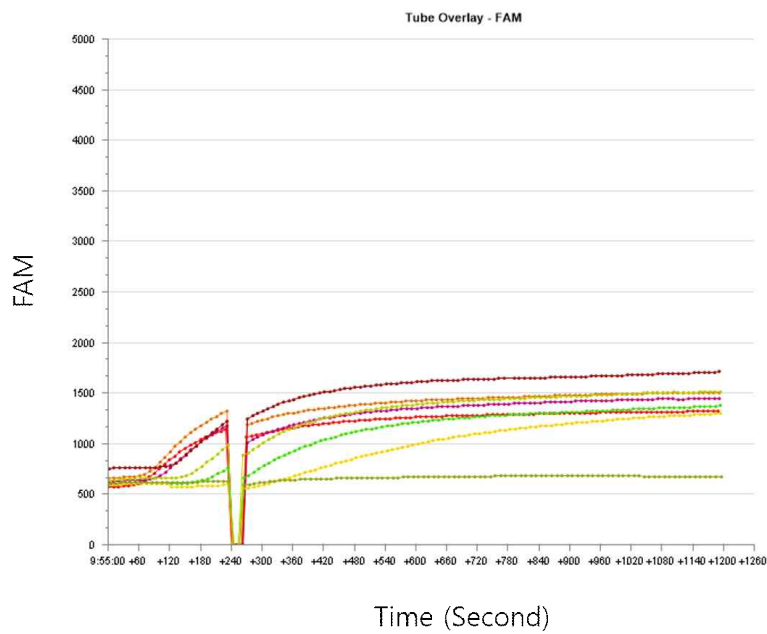
<그림 1-29> Specificity of TuMV primer and probe against the several genome of bacteria.

```

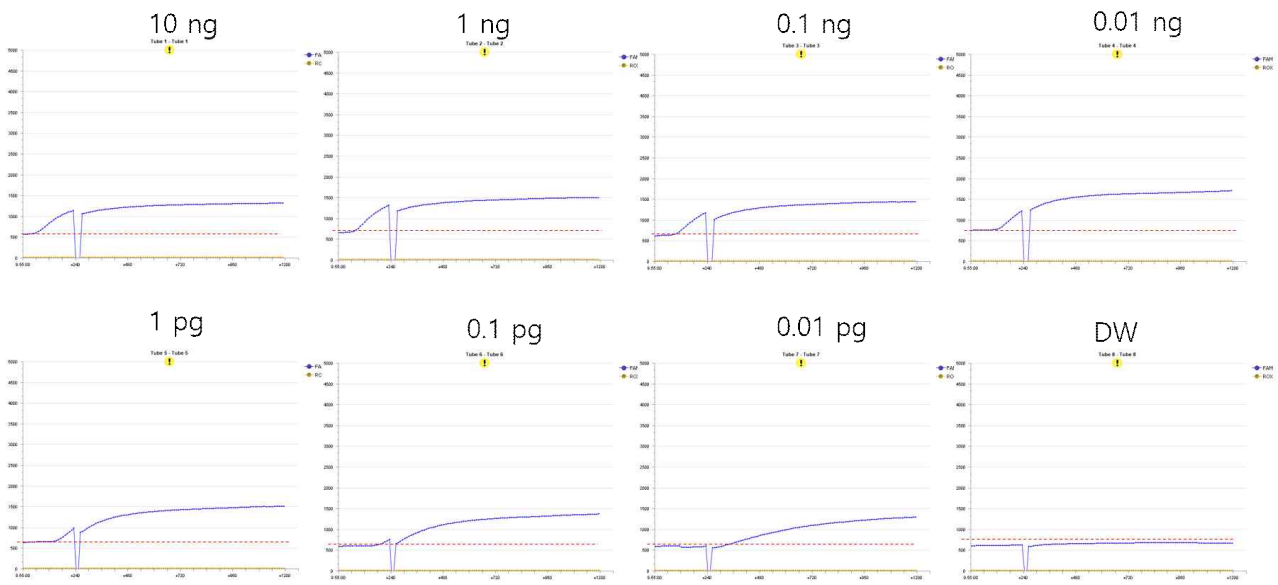
GTTATGAAGTXXXXXXCTAGTAGACTATAAGXXXXTAAGTTTA
CTCGTTAGTATTCTCGCTTATGGGAAATATGTXXXXTTGTTAAA
GCAGCCAGXXXXXXXXXXCGTCATGTGTGTTGTTGTTACTTTC
TATATTTTCGCCGAACATTXXXXG

```

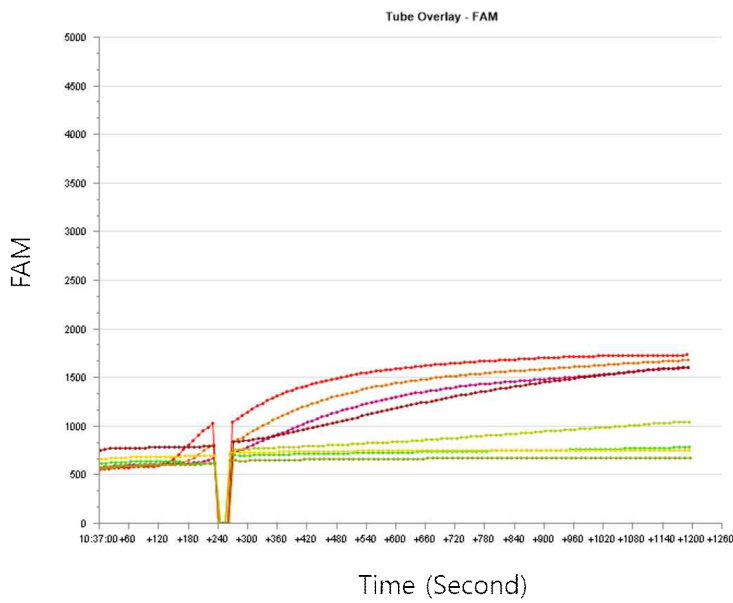
<그림 1-30> Synthetic target gene of TuMV primer set.



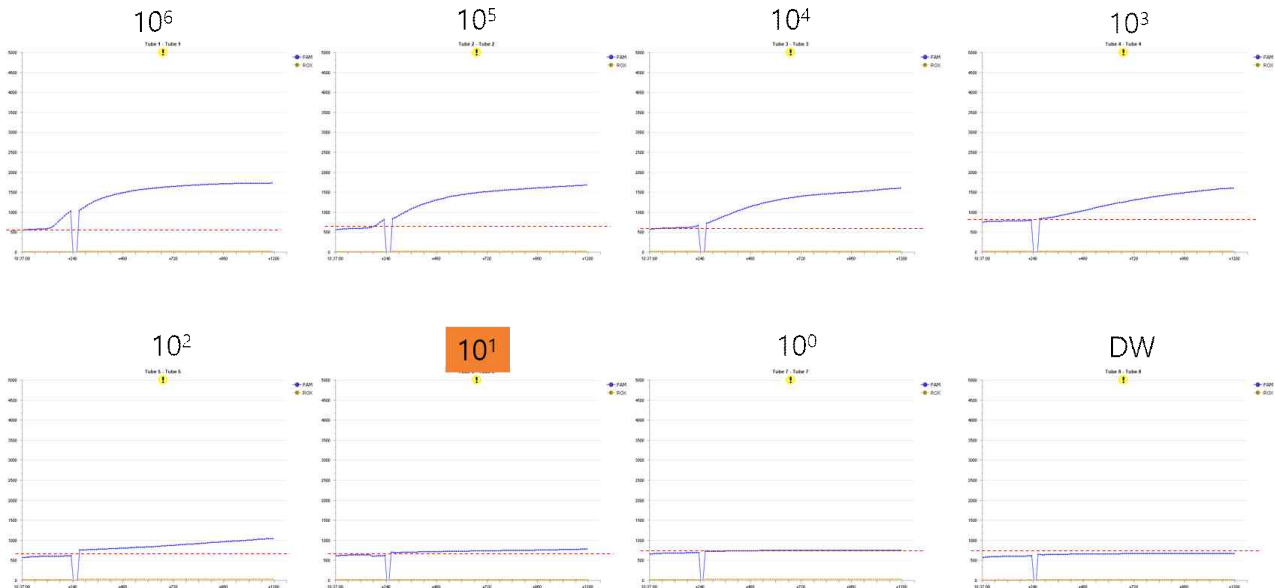
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TuMV2-9,622 F	0.7 ul
TuMV2- 9,770 R	0.7 ul
TuMV2- 9,670 P 0.5 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-31> Sensitivity of TuMV primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TuMV2-9,622 F	0.7 ul
TuMV2- 9,770 R	0.7 ul
TuMV2- 9,670 P 0.5 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-32> Sensitivity of TuMV primer and probe (copies/ul).

- TuMV 유전자 31건에 대한 유전자를 분석한 결과 3개의 sub type으로 나뉘었다 (그림 1-24, 25).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, TuMV gene의 중간부분과 말단부 위에서 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 말단부위에서 하나의 프라이머 프로브 세트 (빨간 점선 박스)를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; TuMV-9622F, TuMV2-9670P, TuMV-9770R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-26, 27).
- RPA Exo kit를 사용하여 6가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, TuMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-28).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반

양성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-29).

- TuMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-30).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 0.01 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-31).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 10 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-32).
- 이상의 결과로 RT-RPA TuMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-33).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-34).
- TuMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠씨아이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-35).



<그림 1-33> TuMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-TuMV-ER-50

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-TuMV-ER-0001
Issue Date: Jul 24, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
Tel: +82-02-1588-3546 www.yuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggi-do South Korea.
Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of TuMV gene to detect the TuMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Turnip mosaic virus (TuMV) is a *Potyvirus* of the family *Potyviridae* that causes diseases in *cruciferous* plants, among others. The virus is usually spread by 40-50 species of *aphids* in a non-persistent manner. Infected plants, especially the natural hosts, show symptoms such as chlorotic local lesions, mosaic, mottling, puckering or rugosity. TuMV is a positive-sense single stranded *RNA virus*, consisting of a non-enveloped, helical *capsid* that is filamentous and *flexuous*, with an average length of 720 nm. The TuMV genome is linear and monopartite (single particle). The virus has a thermal inactivation point (TIP) of 62 °C, and longevity in vitro (LIV) of 3-4 days.

The Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Turnip mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the TuMV gene for the unique amplification of Turnip mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	TuMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	TuMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	TuMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	TuMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner / CFX96 real time PCR / Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	TuMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	TuMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	TuMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

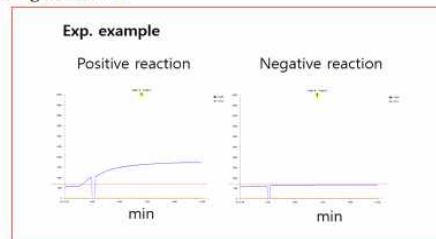
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
* It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
* Unknown: clinical sample
* Negative control
* Positive control

8. Reading the Result



<Example of TuMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	TuMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	TuMV Positive
2	+	-	-	TuMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.


LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-34> Insert of TuMV ER Detection kit.

LCM SCIENCE
LIFE SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit

Turnip mosaic virus (TuMV) 순무 모자이크 바이러스



제품 소개

순무 모자이크 바이러스 (TuMV)는 순무, 양배추, 콜리플라워 등 십자화과 식물에 감염되는 바이러스입니다. 감염된 식물은 잎에 황색 무늬와 모자이크 현상을 보이며, 결국 식물의 생장과 수확량을 감소시킵니다. 본 제품은 순무 모자이크 바이러스를 신속하고 정확하게 검출하기 위한 진단 키트입니다.

주요 특징

- 순무 모자이크 바이러스 (TuMV)를 신속하고 정확하게 검출할 수 있습니다.
- 간편한 사용법으로 현장에서 즉시 검사할 수 있습니다.
- 높은 특이도와 민감도를 자랑하며, 다양한 샘플에서 검출 가능합니다.

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit는
감염된 식물로부터 TuMV를 검출하여 정량 분석하는 연구용 제품입니다.

LCM SCIENCE
LIFE SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

사용 목적

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 TuMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품 특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대내 높은 민감도
- 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE
LIFE SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

제품 스펙

검체	TuMV 감염 의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-TuMV-ER-50	Turnip mosaic virus (RMV) ER - Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

LCM SCIENCE
LIFE SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

제품설명서



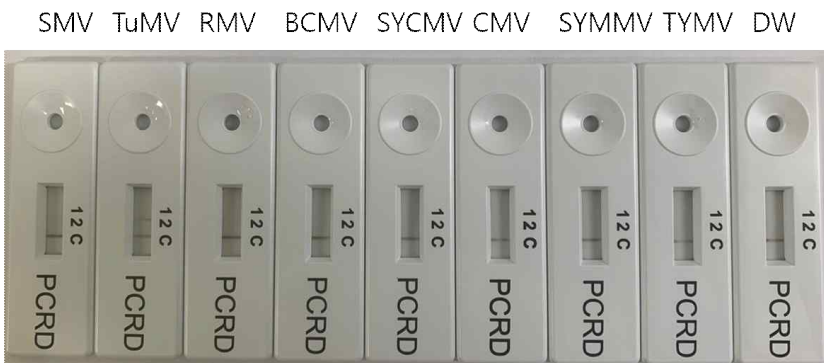
LCM SCIENCE
LIFE SCIENCE & BIOTECHNOLOGY

<그림 1-35> Contents of TuMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ TuMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

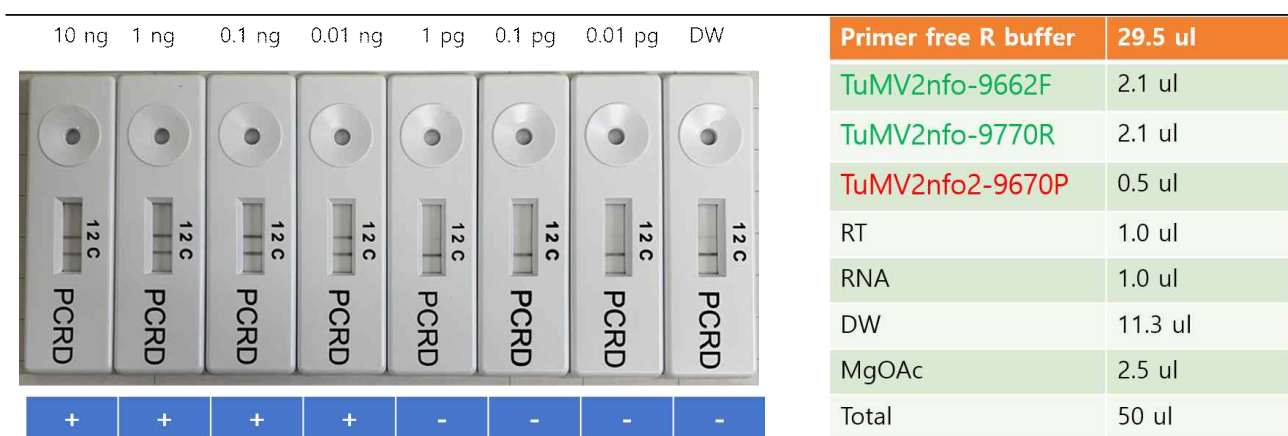
1. TuMV2nfo-9,622 F:
5'- ATG XXX TTG TAT XXX AGT AGA XXX TAA GTA XXX AA -3'
2. TuMV2nfo- 9,670 P:
5'- [FAM] TTA XXX GTT XXX ATT CTC GCT TAT XXX AAA TA [THF]
GT AAG TTT GTT XXX GCA – C3 Spacer
3. TuMV2nfo- 9,770 R:
5'- [Biotin] AAT XXX ATG TTC GGC XXX AAT ATA GAA XXX AAC AA -3'

<그림 1-36> RPA nfo primer probe set of TuMV.

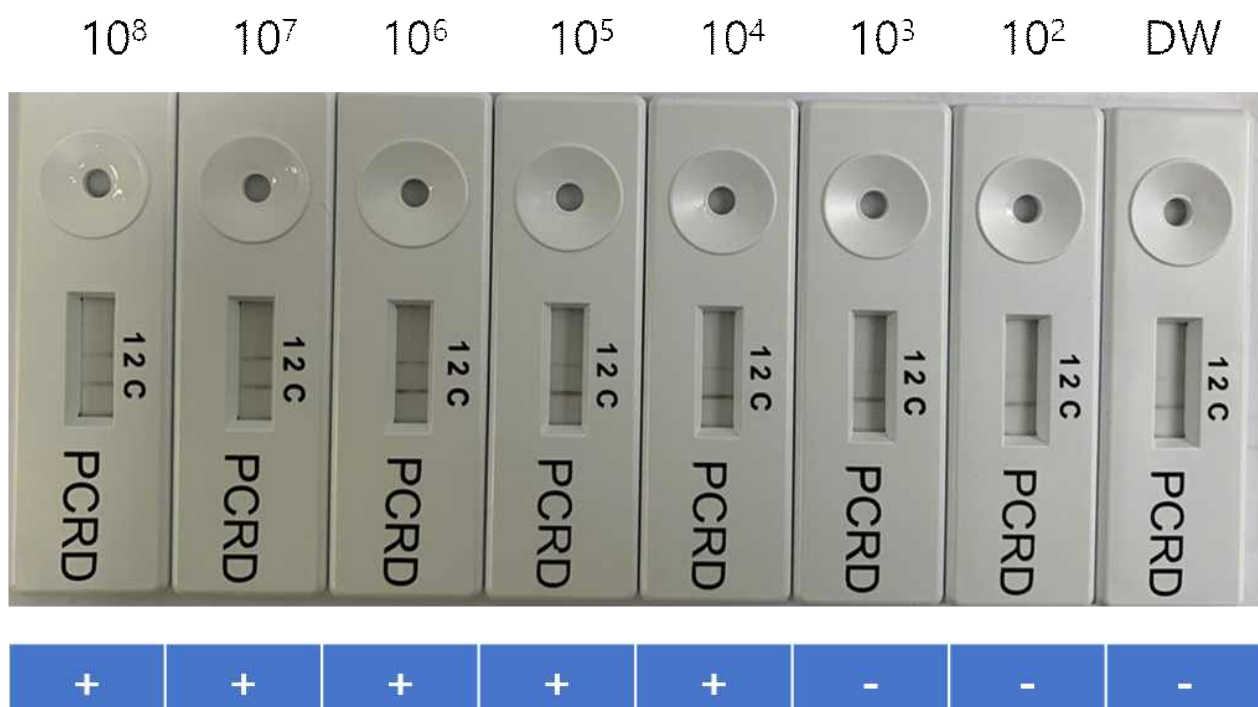


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TuMV2nfo-9662F	0.8 ul
TuMV2nfo-9770R	0.8 ul
TuMV2nfo2-9670P	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul

<그림 1-37> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of TuMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).



<그림 1-38> Sensitivity of TuMVnfo primer and probe (concentration).



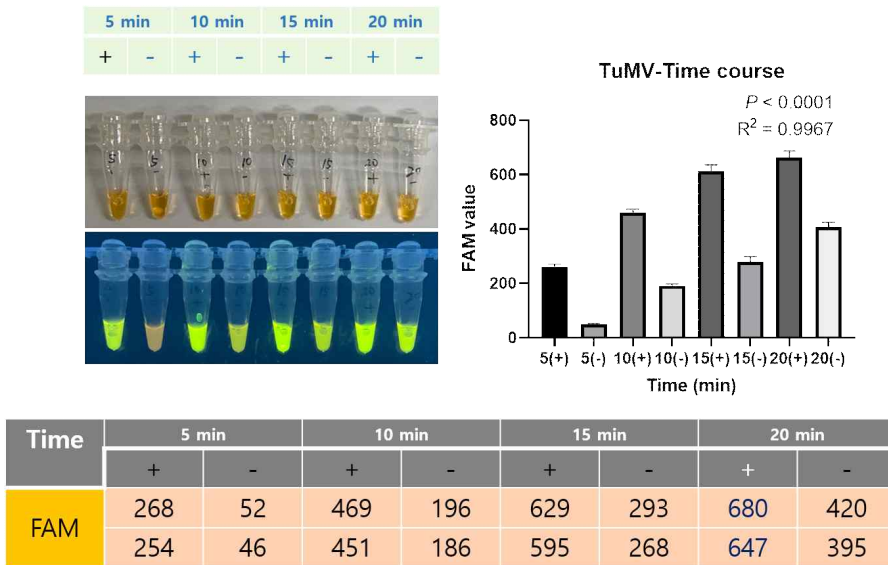
<그림 1-39> Sensitivity of TuMVnfo primer and probe (copies/ul).

reagent	volume	1	2	3	4	5	6	DW	No	Bacteria	result				
2x R Buffer	10 ul								1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative				
100 mM dNTP	0.7 ul								2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative				
10x B	2 ul								3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative				
20x B	1 ul								4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative				
50x B	0.4 ul								5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative				
RT	0.4 ul								6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative				
TuMV2nfo-9662F	0.8 ul	7	8	9	10	11	12	+	DW	7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative			
TuMV2nfo-9770R	0.8 ul									8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative			
TuMV2nfo2-9670P	0.3 ul									9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative			
MgOAc	1.6 ul									10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative			
RNA	1.0 ul									11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative			
DW	1.0 ul									12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative			
Total	20 ul									13	14	15	16	17	+
										14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative			
										15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative			
										16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative			
										17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative			
										+	+	DW	18	Distilled water	Negative
										+	+	DW	Positive control	TuMV - mRNA transcript	Positive

<그림 1-40> Specificity of TuMV primer and probe against the several genome of bacteria.

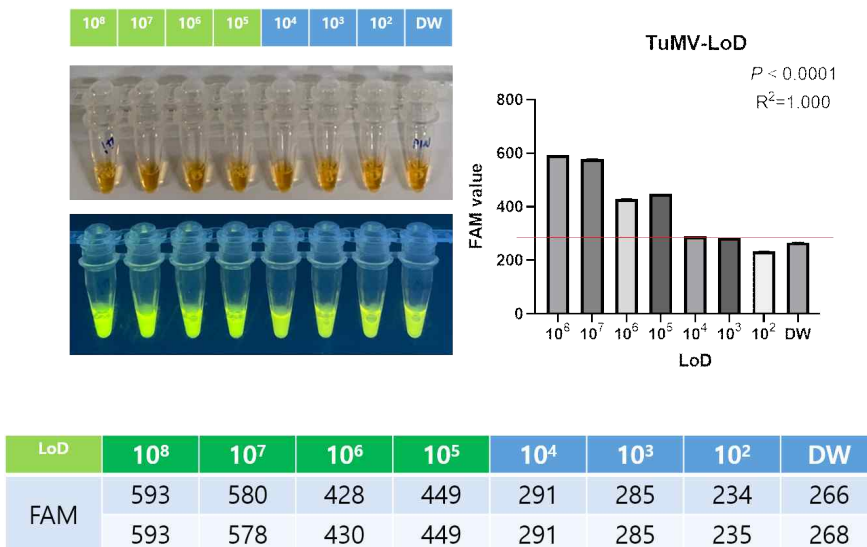
- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT TuMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-36).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-37과 같이 nfo primer probe는 TuMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.01 ng 까지 반응을 하였다 (그림 1-38).
- 목표유전자를 10⁸ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 10,000 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-39).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-40).

■ TuMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



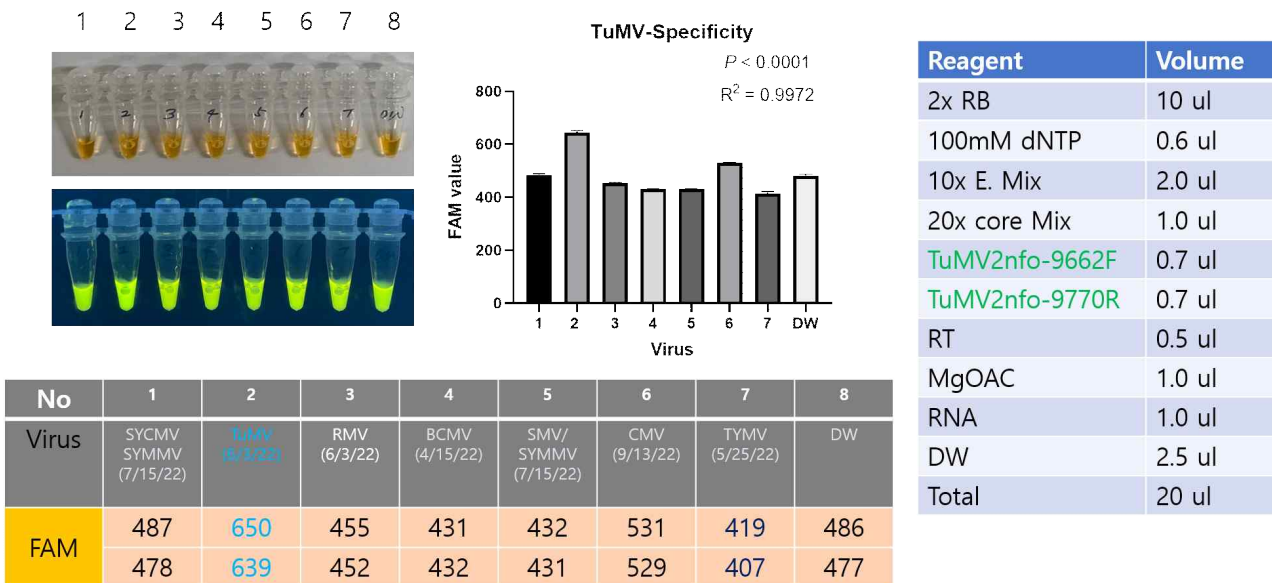
Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
TuMV2nfo-9662F	0.7 ul
TuMV2nfo-9770R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

<그림 1-41> RPA end point reaction with primer set of TuMV according to the time.



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
TuMV2nfo-9662F	0.7 ul
TuMV2nfo-9770R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

<그림 1-42> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of TuMV.



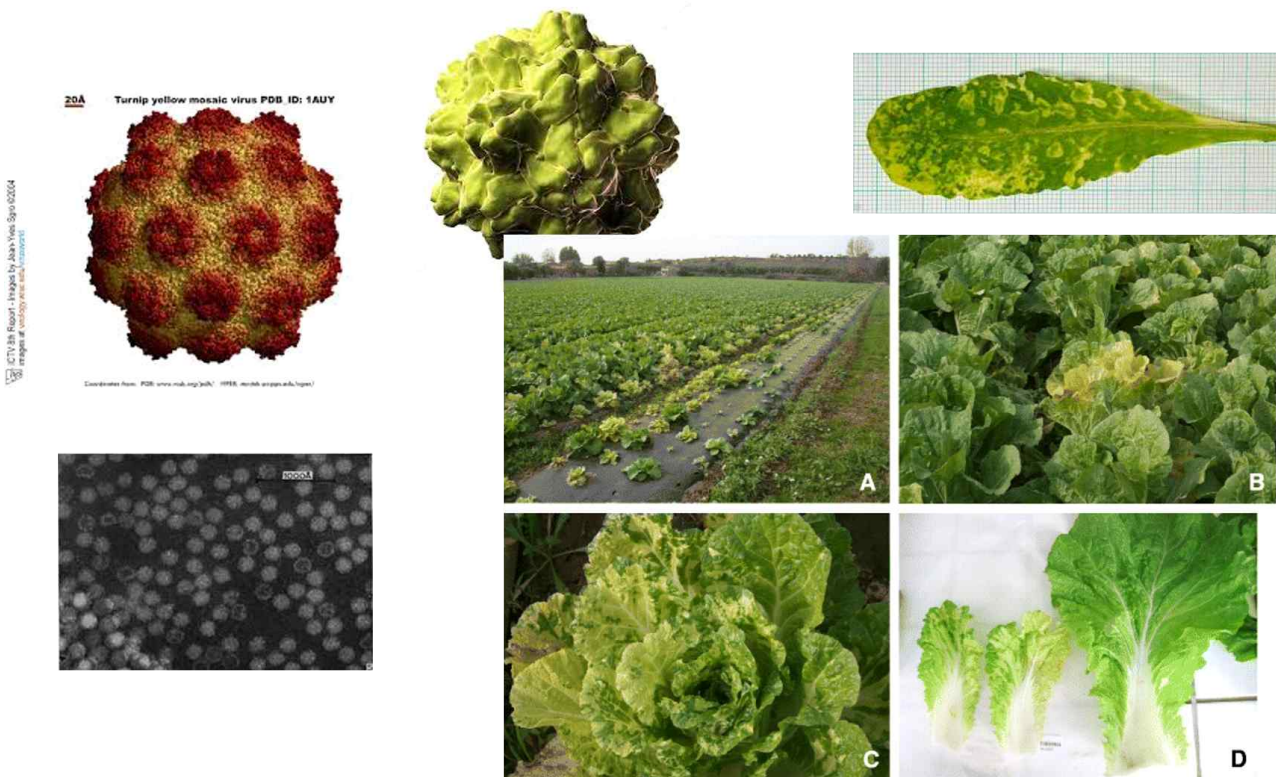
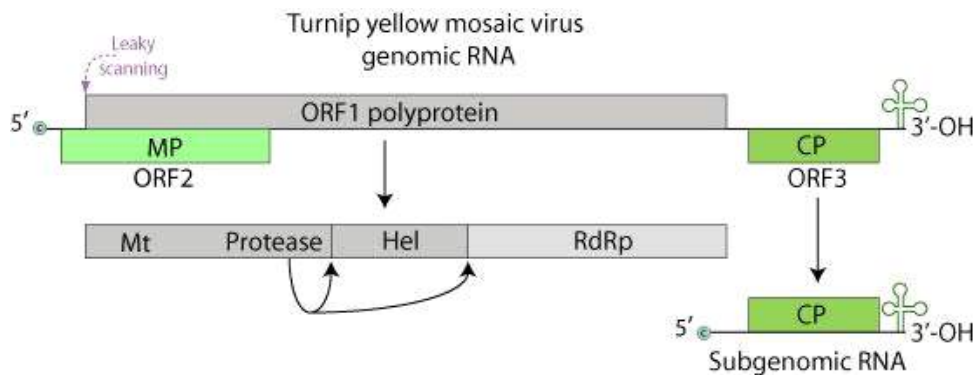
<그림 1-43> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of TuMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT TuMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 5분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-41).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^8 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 13분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^5 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-42).
- 그림 1-43와 같이 nfo primer probe는 TuMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

3. Turnip yellow mosaic virus (TYMV) - RPA probe 진단제 개발

■ 주관연구기관-엘씨엠사이언스 (주) 연구결과

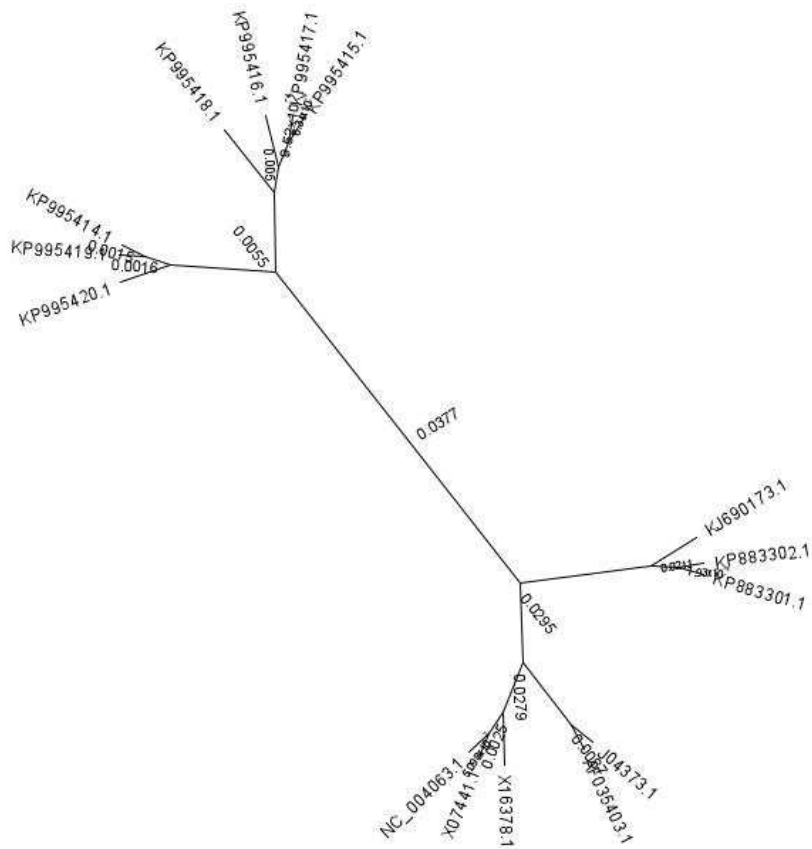
- 순무 황색 모자이크 바이러스(TYMV)는 Tymoviridae 계통의 등척성 Tymovirus입니다. 숙주 범위는 양배추, 콜리플라워 및 브로콜리를 포함하는 서부 유럽의 브라시카 속의 식물에 거의 전적으로 국한됩니다. 감염은 식물 조직의 정맥 청소 및 탈피를 나타내는 밝은 노란색 모자이크 질병을 유발합니다. 수액뿐만 아니라 많은 곤충 매개체에 의해 전염됩니다. 이들 중 가장 눈에 띄는 것은 벼룩 딱정벌레의 필로트레타(Phyllotreta) 및 실리오데스(Psyllodes) 속이지만, 파에돈 달팽이관(Phaedon cochleariae)과 그 유충도 이 바이러스를 퍼뜨리는 데 도움이 되는 것으로 알려져 있습니다. 유충은 번데기 단계에 도달하면 질병을 전염시키는 능력을 상실하여 기계적 감염 과정을 암시합니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Turnip_yellow_mosaic_virus).



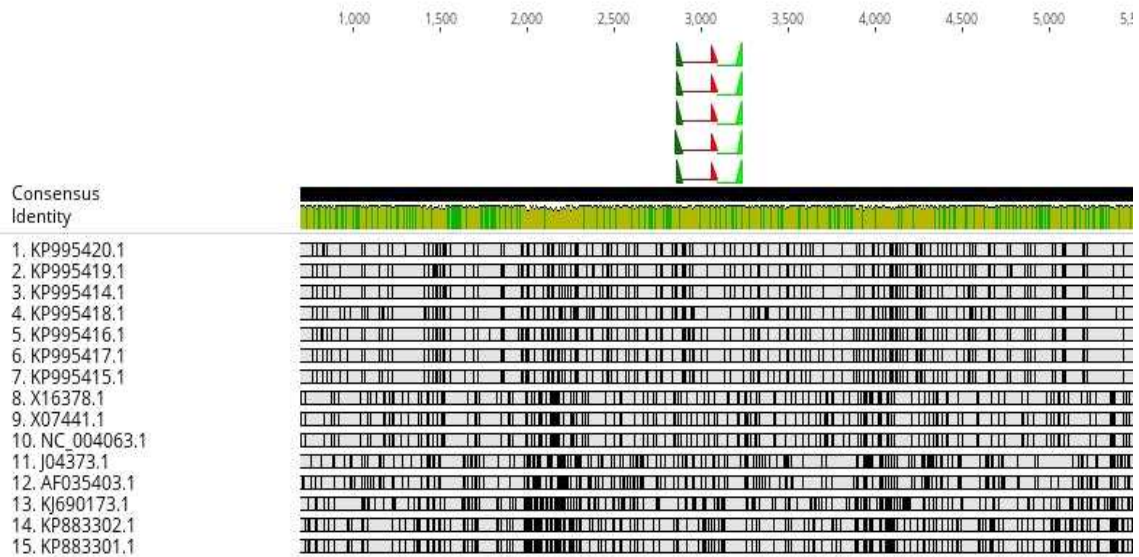
<그림 1-44> Genetic map, symptom, model of TYMV.

	KP995420.1	KP995419.1	KP995414.1	KP995418.1	KP995416.1	KP995417.1	KP995415.1	X16378.1	X07441.1	NC_004063.1	J04373.1	AF035403.1	KJ690173.1	KP883302.1	KP883301.1
KP995420.1		99.7%	99.7%	98.8%	98.8%	98.9%	99.0%	93.5%	93.5%	93.5%	92.7%	92.7%	92.2%	92.3%	92.4%
KP995419.1	99.7%		99.7%	98.8%	98.8%	98.9%	99.0%	93.5%	93.5%	93.5%	92.7%	92.7%	92.2%	92.2%	92.4%
KP995414.1	99.7%	99.7%		98.9%	98.9%	99.0%	99.1%	93.6%	93.5%	93.5%	92.8%	92.8%	92.2%	92.3%	92.4%
KP995418.1	98.8%	98.8%	98.9%		98.9%	99.0%	99.1%	93.6%	93.6%	93.6%	92.9%	93.0%	92.3%	92.3%	92.4%
KP995416.1	98.8%	98.8%	98.9%	98.9%		99.8%	99.8%	93.6%	93.5%	93.5%	92.9%	92.9%	92.3%	92.2%	92.3%
KP995417.1	98.9%	98.9%	99.0%	99.0%	99.8%		99.9%	93.7%	93.6%	93.6%	92.9%	92.9%	92.3%	92.3%	92.4%
KP995415.1	99.0%	99.0%	99.1%	99.1%	99.8%	99.9%		93.7%	93.6%	93.6%	93.0%	93.0%	92.3%	92.3%	92.5%
X16378.1	93.5%	93.5%	93.6%	93.6%	93.6%	93.7%	93.7%		99.4%	99.4%	94.8%	94.7%	94.1%	94.2%	94.3%
X07441.1	93.5%	93.5%	93.5%	93.6%	93.5%	93.6%	93.6%	99.4%		99.9%	94.6%	94.6%	94.1%	94.1%	94.2%
NC_004063.1	93.5%	93.5%	93.5%	93.6%	93.5%	93.6%	93.6%	99.4%	99.9%		94.6%	94.6%	94.1%	94.1%	94.2%
J04373.1	92.7%	92.7%	92.8%	92.9%	92.9%	92.9%	93.0%	94.8%	94.6%	94.6%		98.3%	94.7%	94.6%	94.7%
AF035403.1	92.7%	92.7%	92.8%	93.0%	92.9%	92.9%	93.0%	94.7%	94.6%	94.6%	98.3%		94.6%	94.6%	94.7%
KJ690173.1	92.2%	92.2%	92.2%	92.3%	92.3%	92.3%	92.3%	94.1%	94.1%	94.1%	94.7%	94.6%		95.9%	96.0%
KP883302.1	92.3%	92.2%	92.3%	92.3%	92.2%	92.3%	92.3%	94.2%	94.1%	94.1%	94.6%	94.6%	95.9%		99.8%
KP883301.1	92.4%	92.4%	92.4%	92.4%	92.3%	92.4%	92.5%	94.3%	94.2%	94.2%	94.7%	94.7%	96.0%	99.8%	

<그림 1-45> Homology distance of TYMV isolates.



<그림 1-46> Phylogenetic tree of TYMV genes.



<그림 1-47> Candidate primer and probe sets of TYMV.

1. TYMV- 2,856 F:

5'- CAAXXXXXTAGTTTCAAXXXXXAAGAATGGATT-3'

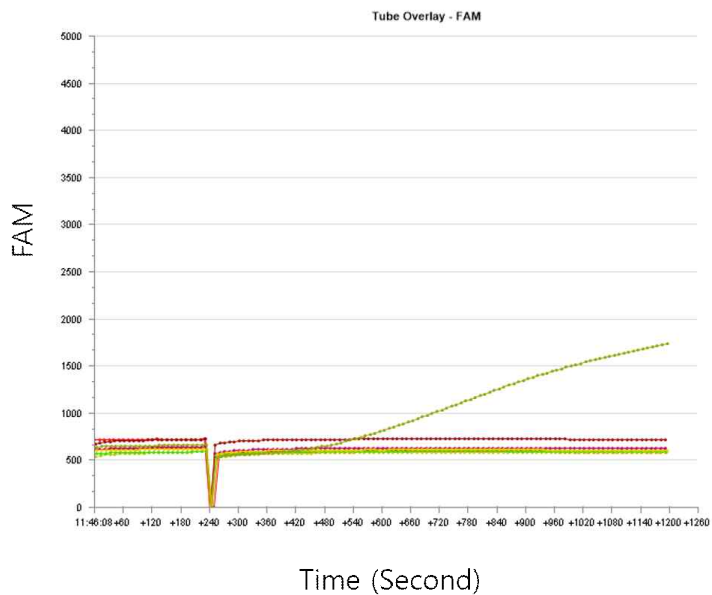
2. TYMV- 3,056 P:

5'- ATC XXX TCC AAC XXX TCC TCA XXX CCA AAC [FAM-dT] T [THF] T [BHQ1-dT]
AAA XXX TTT CGG GTC - Spacer C

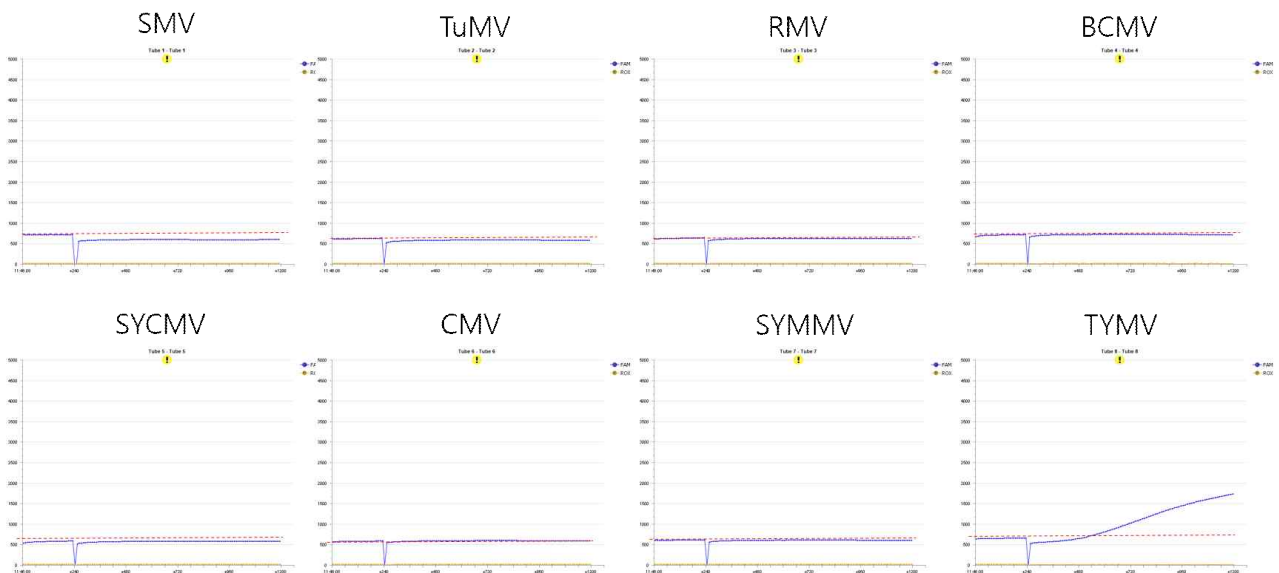
3. TYMV- 3,237 R:

5'-CATTXXXATCTCATCGATXXXXGAATTCT -3'

<그림 1-48> RPA exo primer & probe set of TYMV isolates.



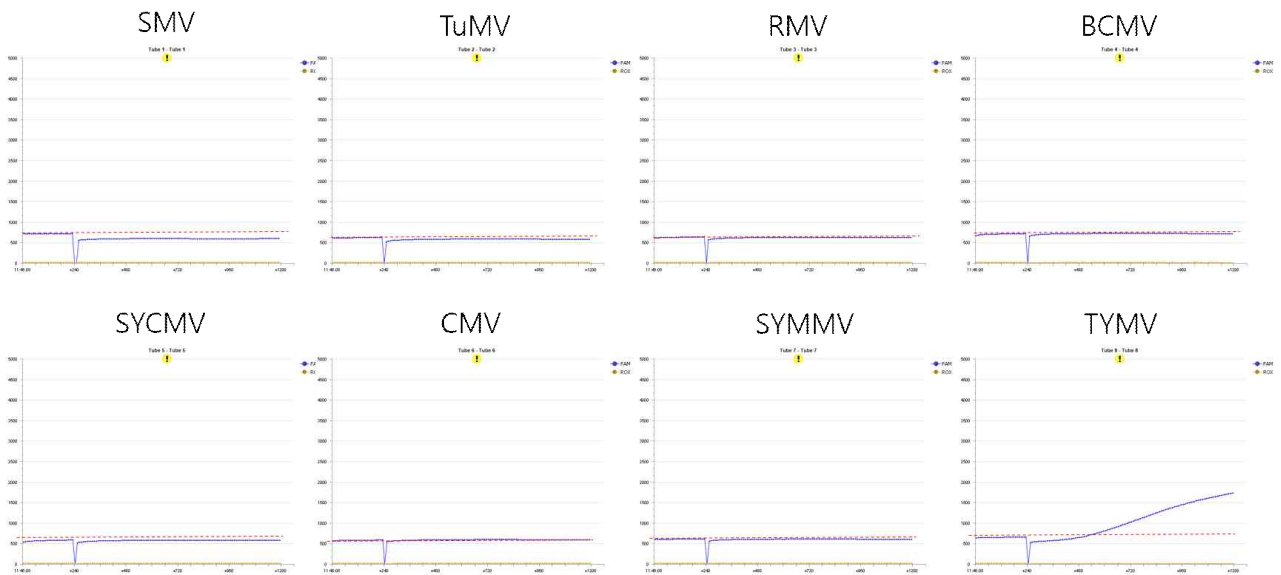
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMV-3237R	0.7 ul
TYMV-3056P (1pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

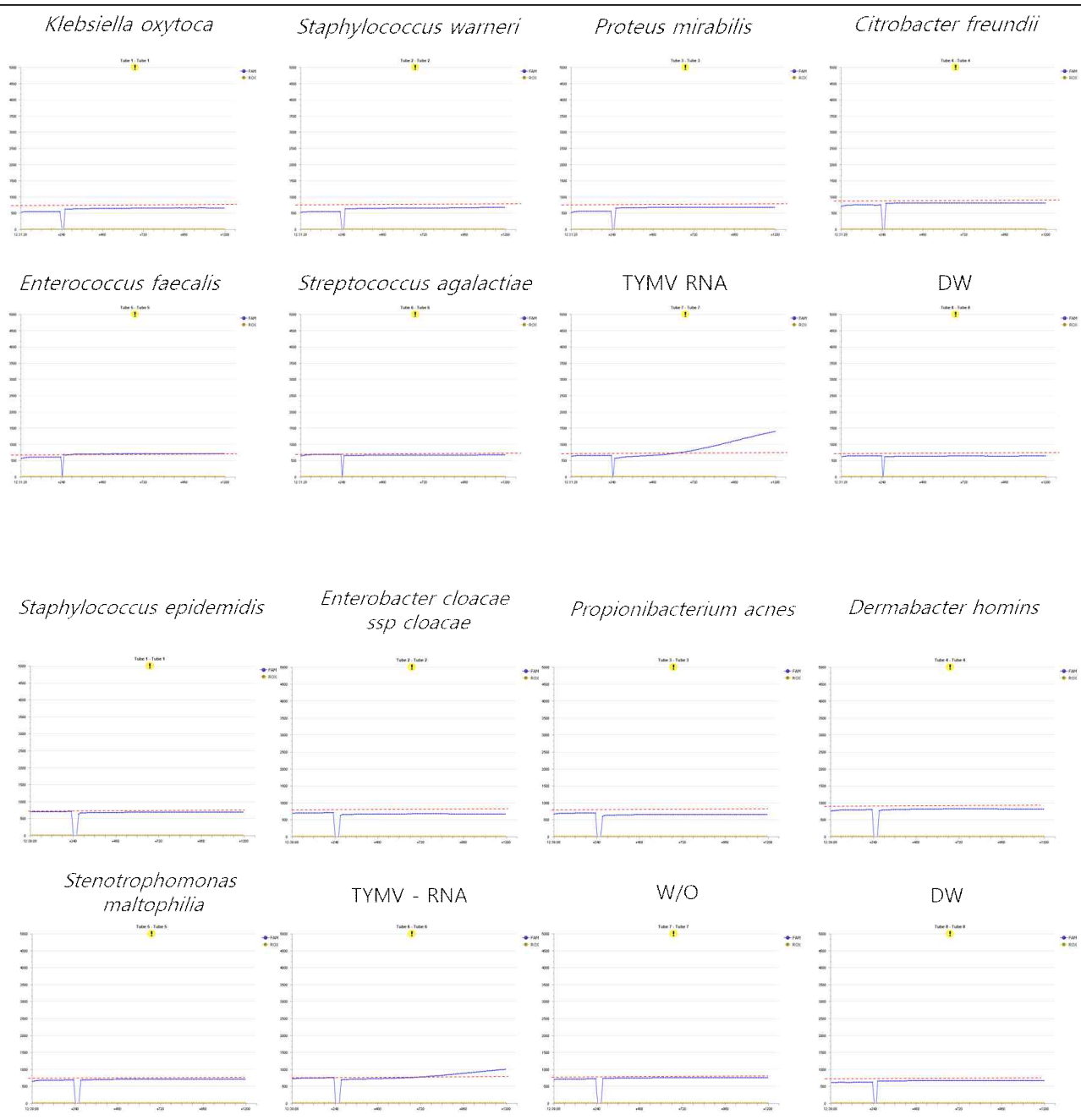


<그림 1-49> Reaction composition of RPA and specificity of TYMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus.

reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMV-3237R	0.7 ul
TYMV-3056P (1pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	TYMV - mRNA transcript	Positive

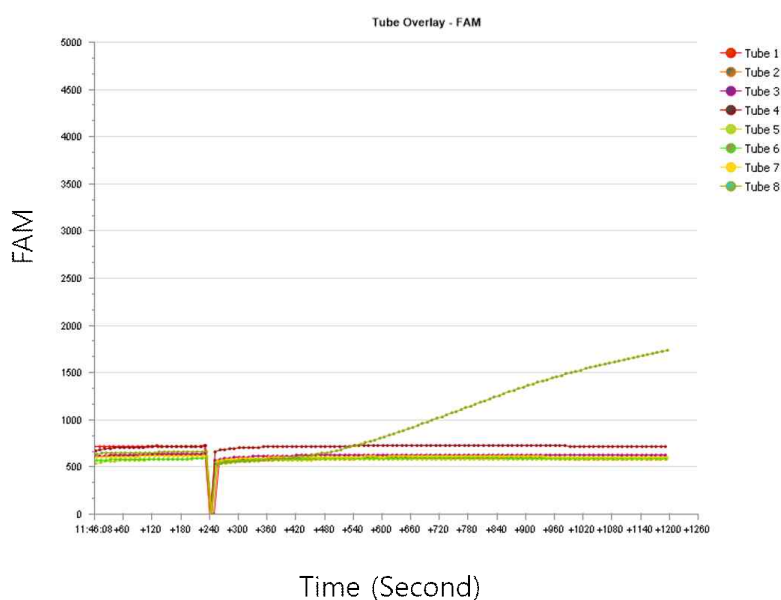




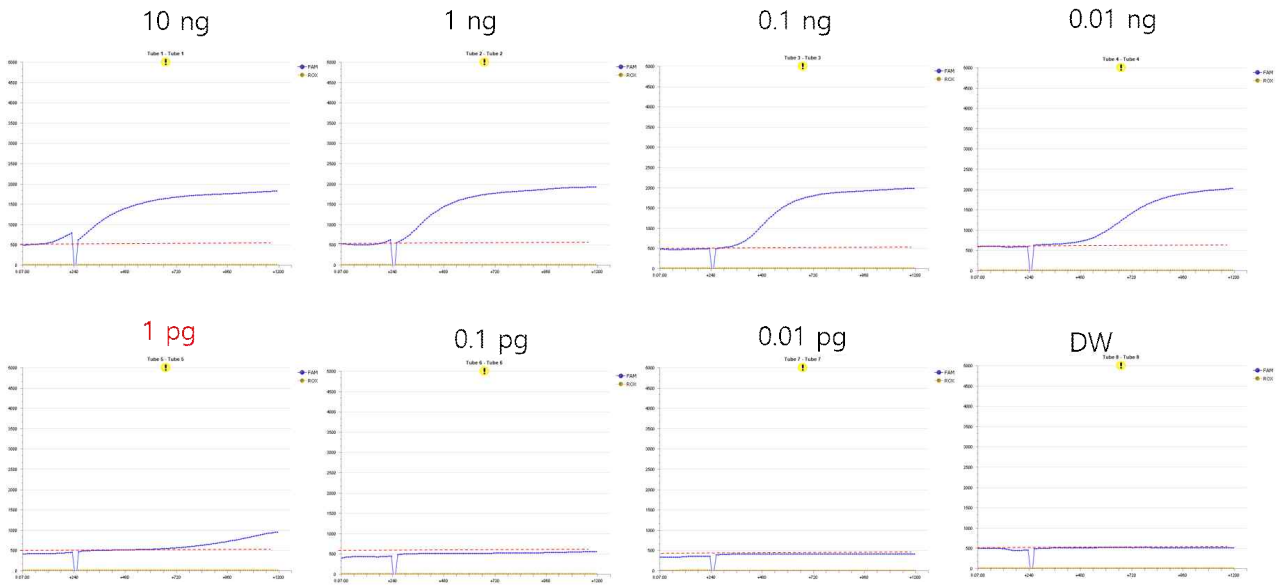
<그림 1-50> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of TYMV with several bacteria.

ATGCCAAGAACTTAGTTTCAAACATGAAGAATGGATTTCGAC
 GGCGXXXXTCCCTCCTCGACGTCTCCACTGGCCAACGAAC
 CGGACCCAC**CCCXXXXXXXXXGATCATCC**AGATAGACCACTAC
 CTCGACACCAACCCCGGCAAAACCACTCCTGTGGTGCATTTT
 GCTGGCTTCGCTGGCTGTGGAAAGACATATCCGATCCAACA
 GCTCCTCAAACCAAACTTTXXXXXXXXTTTCGGGTCTCTTG
 CCCTACCACAGAACTCAGAACCGAATGGAAGACAGCGATG
 GAACXXXXXXXXTCC**CAGTCATGGCGCTTTAACAC**TTGGGA
 GTCTTCCATTCTCAAGTCATCCAGAATTCTGGTCATCGATGAG
 ATCTACAXXXXXXCA

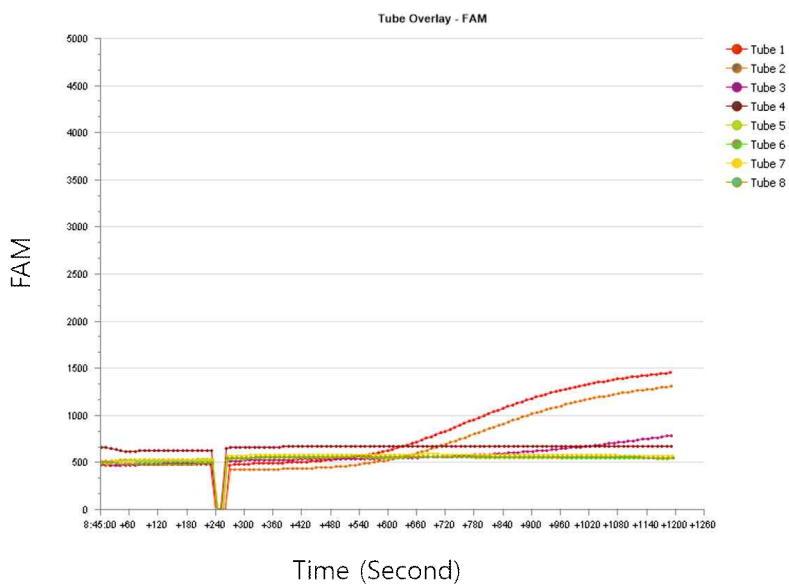
<그림 1-51> Synthetic target gene of TYMV primer set.



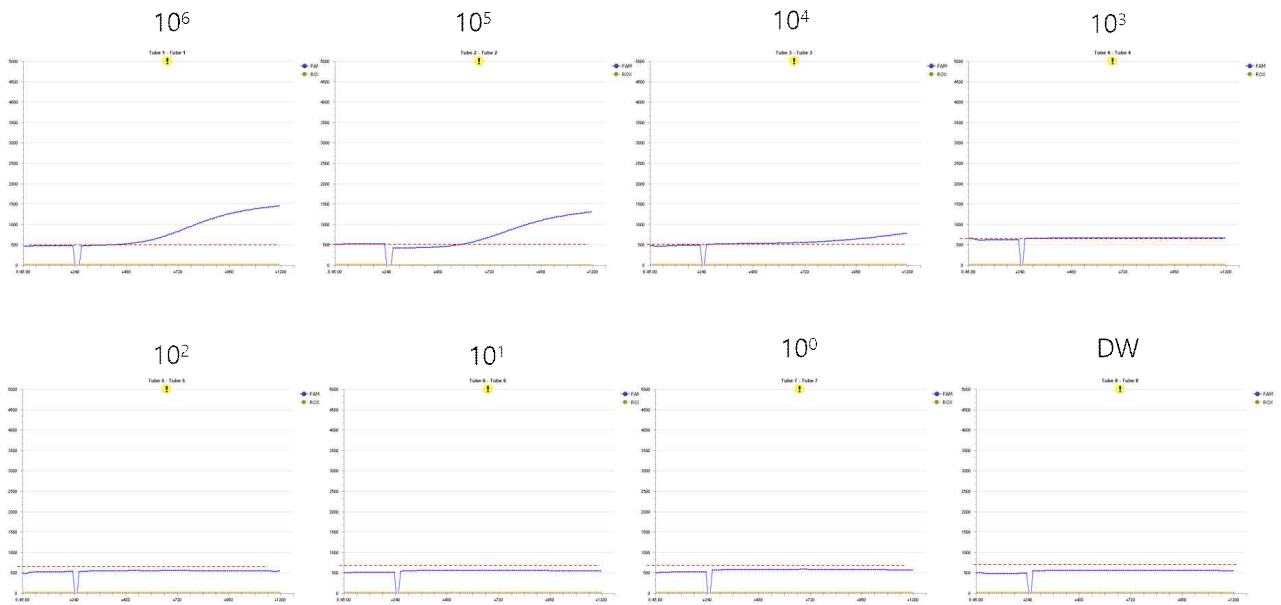
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMV-3237R	0.7 ul
TYMV-3056P (1pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-52> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of TYMV (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMV-3237R	0.7 ul
TYMV-3056P (1pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
DNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-53> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of TYMV (copies/ul).

- TYMV 유전자 15건에 대한 유전자를 분석한 결과 2개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-45, 46).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, TYMV gene의 중간부분에서 여러 개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; TYMV-2856F, TYMV-3056P, TYMV-3237R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-47, 48).
- RPA Exo kit를 사용하여 8가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, TYMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-49).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-50).
- TYMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-51).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간

T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-52).

- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 10,000 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-53).
- 이상의 결과로 RT-RPA TYMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-54).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-55).
- TYMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠싸이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-56).



<그림 1-54> TYMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-TYMV-ER-50

Turnip yellow mosaic virus (TYMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-TYMV-ER-0001
Issue Date: Jul 24, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
Tel: +82-02-1588-3546 www.vuglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggido South Korea.
Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Turnip yellow mosaic virus (TYMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of TYMV gene to detect the TYMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Turnip yellow mosaic virus (TYMV) is an isometric *Tymovirus* of the family *Tymoviridae*. Its host range is confined almost entirely to plants in the genus *Brassica* in western Europe, which includes cabbages, cauliflower and broccoli. Infection causes bright yellow mosaic disease showing vein clearing and mottling of plant tissues. It is transmitted by sap as well as a host of insect vectors.

The most prominent of these are in the *Phyllotreta* and *Psylliodes* genera of beetles, although *Phaedon cochleariae* and its larva have also been known to help spread this virus. The larva lose their ability to transmit the disease once they reach the pupal stage, suggesting a mechanical infection process.

The Turnip yellow mosaic virus (TYMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Turnip yellow mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the TYMV gene for the unique amplification of Turnip yellow mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	TYMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	TYMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	TYMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	TYMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	TYMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112.0 µl
2	TYMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	TYMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

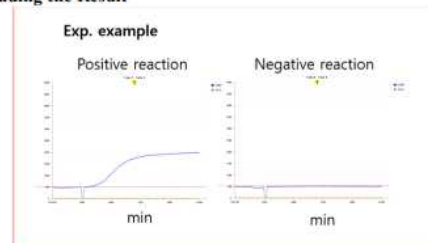
* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

- Plate setup
 - Set the fluorophores with FAM.
 - Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of TYMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	TYMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	TYMV Positive
2	+	-	-	TYMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.


LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-55> Insert of TYMV ER Detection kit.

LCM SCIENCE
LIFE CHEMICAL MATERIALS

Turnip Yellow mosaic virus (TYMV) ER-Detection Kit

Turnip yellow mosaic virus (TYMV) 순무 황화 모자이크 바이러스



Turnip yellow mosaic virus (TYMV) 순무 황화 모자이크 바이러스는 순무에 감염을 일으키는 바이러스로, 순무의 잎과 줄기에 노란색 반점과 줄기 굽힘을 유발합니다. 순무의 생산량과 품질에 심각한 영향을 미칩니다. 본 제품은 순무의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 데 사용됩니다.

본 제품은 순무의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 데 사용됩니다. 순무의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 데 사용됩니다. 순무의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 데 사용됩니다.

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit는 감염된 식물로부터 TuMV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.

LCM SCIENCE
LIFE CHEMICAL MATERIALS

사용 목적

Turnip mosaic virus (TuMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 TuMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE
LIFE CHEMICAL MATERIALS

제품 스펙

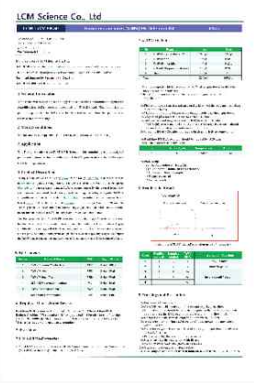
검체	TuMV 감염의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-TYMV-ER-50	Turnip mosaic virus (RMV) ER - Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

LCM SCIENCE
LIFE CHEMICAL MATERIALS

제품설명서



LCM SCIENCE
LIFE CHEMICAL MATERIALS

<그림 1-56> Contents of TYMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ TYMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. TYMVnfo- 2,856 F:

5'- CAAXXXTTAGTTTCAAXXXTGAAGAATXXXATT-3'

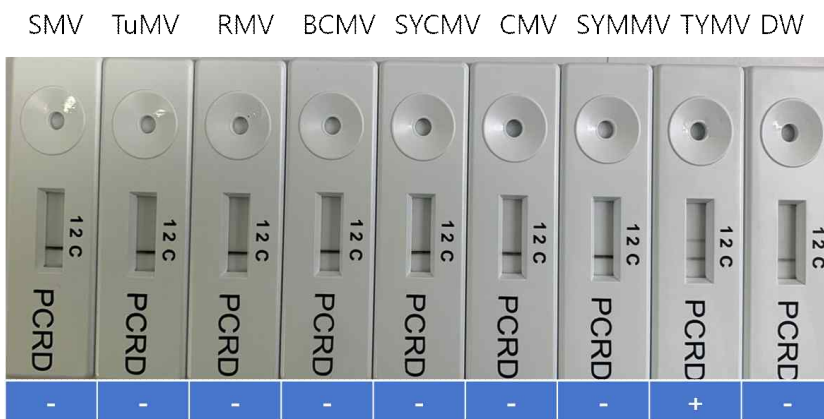
2. TYMVnfo- 3,056 P:

5'- [FAM] ATC XXX TCC XXX AGC TCC XXX AAA CCA XXX TT [THF] TT
AAA GAC XXX CGG GTC – C3 Spacer

3. TYMVnfo- 3,237 R:

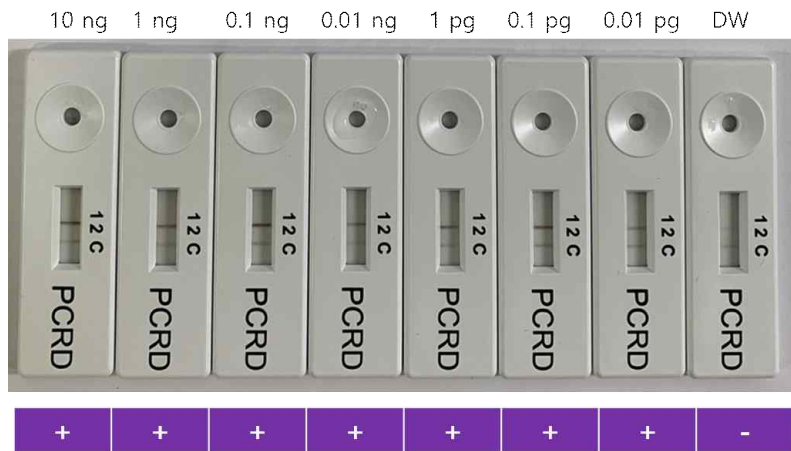
5'- [Biotin] CATTXXXTAGATCTCXXXGATGACCXXXATTCT -3'

<그림 1-57> RT-RPA nfo primer probe set of TYMV.



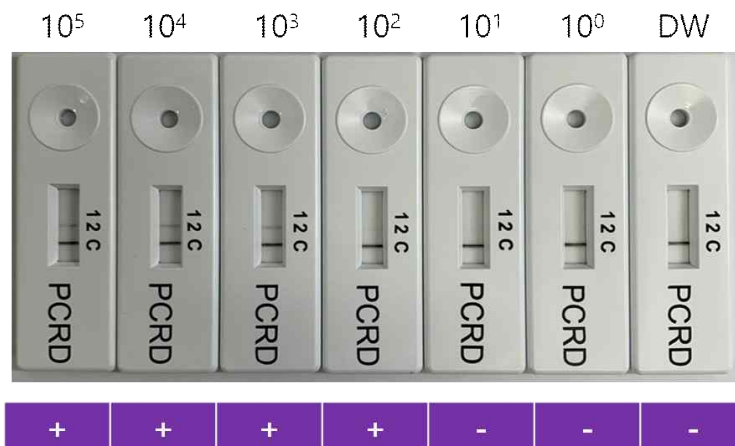
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMVnfo-3237R	0.7 ul
TYMVnfo-3056P (10 pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
DNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-58> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of TYMVnfo primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip Yellow Mosaic virus.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMVnfo-3237R	0.7 ul
TYMVnfo-3056P (10 pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
DNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-59> Sensitivity of TYMVnfo primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
TYMV-2856F	0.7 ul
TYMVnfo-3237R	0.7 ul
TYMVnfo-3056P (10 pM)	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
DNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-60> Sensitivity of TYMVnfo primer and probe (copies/ul).

reagent	volume	1	2	3	4	5	6	+	-
2x R Buffer	10 ul								
100 mM dNTP	0.7 ul								
10x B	2 ul								
20x B	1 ul								
50x B	0.4 ul								
RT	0.4 ul								
TYMV-2856F	0.7 ul								
TYMVnfo-3237R	0.7 ul								
TYMVnfo-3056P (10 pM)	0.3 ul								
MgOAc	1.6 ul								
DNA	1.0 ul								
DW	1.2 ul								
Total	20 ul								

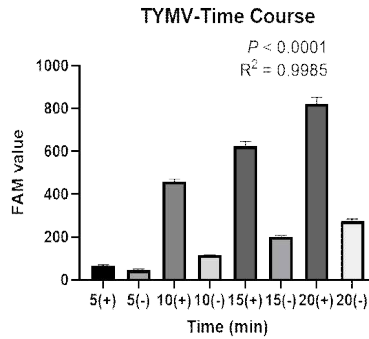
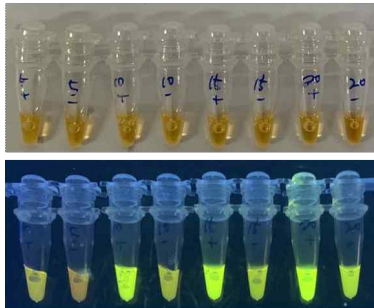
No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	TYMV DNA	Positive

<그림 1-61> Specificity of TYMVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT TYMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-57).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-58과 같이 nfo primer probe는 TuMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.01 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-59).
- 목표유전자를 10⁵ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 100 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-60).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-61).

■ TYMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과

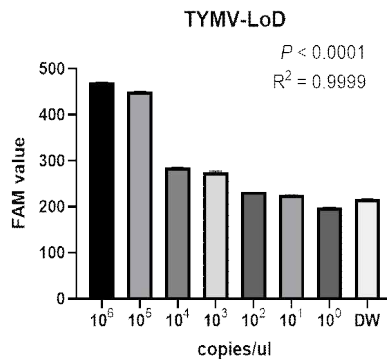
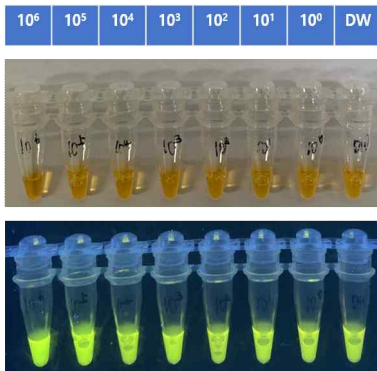
5 min		10 min		15 min		20 min	
+	-	+	-	+	-	+	-



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
TYMVnfo 2856 F	0.7 ul
TYMVnfo 3237 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	69	49	468	117	610	198	844	282
	64	42	451	115	641	206	801	269

<그림 1-62> RPA end point reaction with primer set of TYMV according to the time.

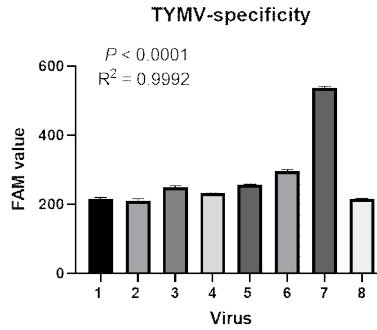
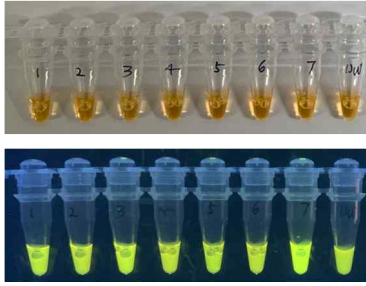


Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
TYMVnfo 2856 F	0.7 ul
TYMVnfo 3237 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	469	449	284	274	233	225	198	216
	471	451	286	277	233	226	199	217

<그림 1-63> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of TYMV.

1 2 3 4 5 6 7 8



No	1	2	3	4	5	6	7	8
Virus	SMV SYMMV (7/15/22)	TuMV (6/3/22)	RMV (6/3/22)	BCMV (4/15/22)	SYCMV SYMMV (7/15/22)	CMV (9/13/22)	TYMV (5/25/22)	DW
FAM	218 211	214 206	252 246	232 231	258 255	299 292	540 532	217 214

Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
TYMVnfo 2856 F	0.7 ul
TYMVnfo 3237 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

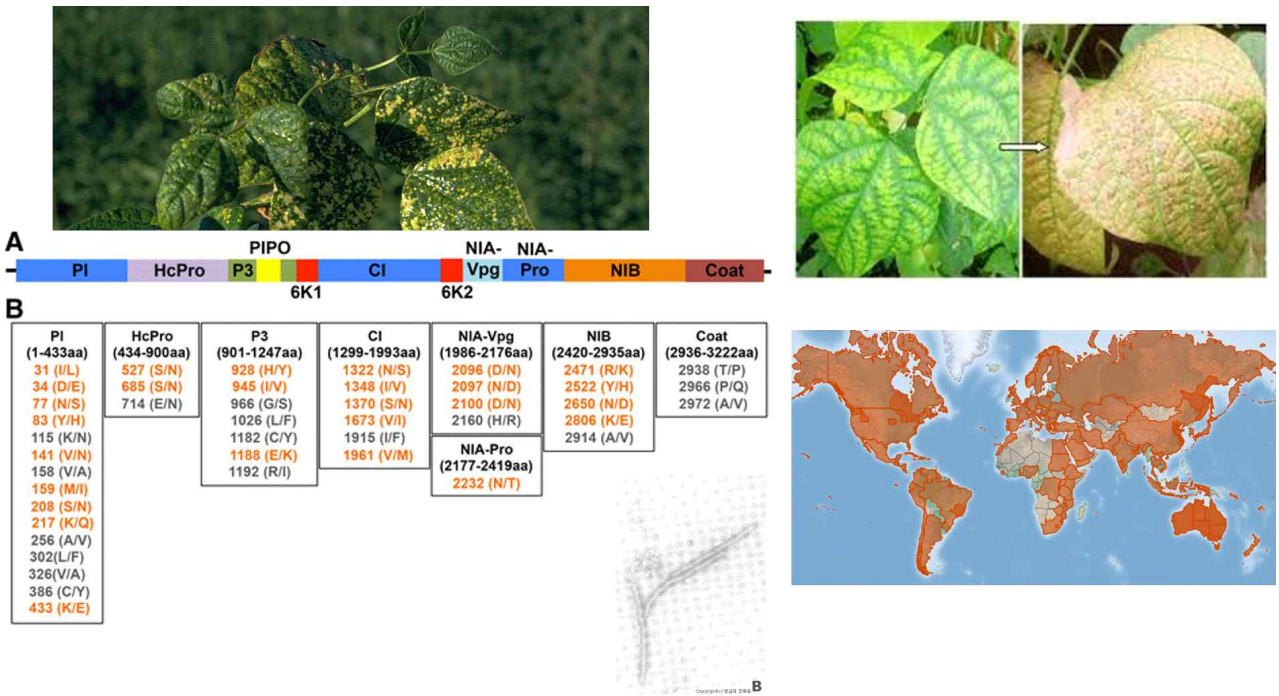
<그림 1-64> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of TYMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT TYMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-62).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10⁶-10⁰ copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 15분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10³ copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-63).
- 그림 1-64와 같이 중간 특이도를 분석한 결과, nfo primer probe는 TYMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-64).

4. Bean common mosaic virus (BCMV) - RPA probe 진단제 개발

■ 주관연구기관-엘씨엠사이언스 (주) 연구결과

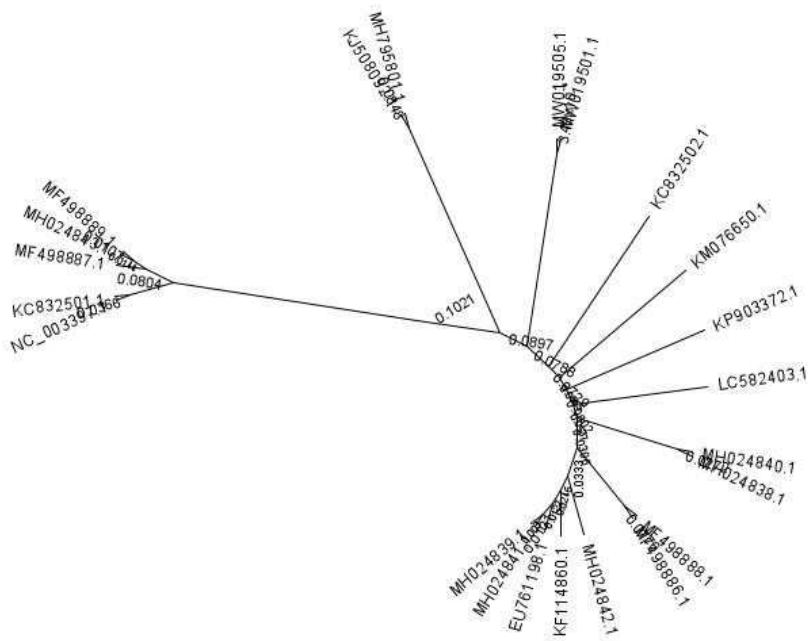
- BCMV 숙주 범위는 제한되어 있지만 자연적으로 감염된 식물에는 일반 콩, *Phaseolus vulgaris* L. var. *aborigineus*, *Rhynchosia minima* (L.) DC 및 일부 야생 열대 *Phaseolus* spp. 증상으로 는 삼엽충 잎에 밝은 녹색과 짙은 녹색 모자이크 패턴이 있습니다. 다른 증상으로는 주름, 물 집, 뒤틀림, 아래쪽으로 말리거나 구르는 것, 경미하거나 심한 녹색 바탕에 녹색 모자이크 반 점이 있습니다. 정확한 노란색 점 또는 괴사성 국소 병변은 종종 식물 성장 감소를 초래할 수 있습니다. 어린 나이에 감염된 식물은 발육부진되고 변형될 수 있습니다. 이 바이러스는 특히 감염된 종자에서 생산 지역과 계절 사이에 퍼집니다. 가장 중요한 매개체는 진딧물이지만 꽃가루와 기계적 전달도 있습니다 (https://en.wikipedia.org/wiki/Bean_yellow_mosaic_virus).



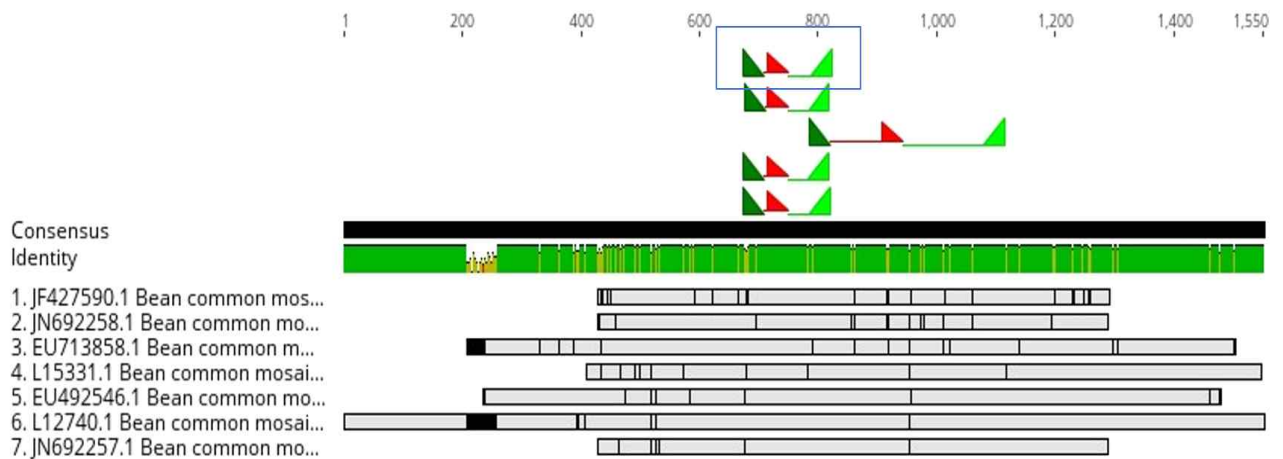
<그림 1-65> Genetic map, symptom, model of BCMV.

MF4988...	MH0248...	MF4988...	NC_003...	KC83250...	KJ50809...	MH7958...	MW019...	MW019...	KC83250...	KM0766...	KP90337...	LC58240...	MH0248...	MH0248...	MF4988...	MF4988...	MH0248...	KF11486...	EU7611...	MH0248...	MH0248...
MF498887.1	97.5%	96.9%	85.6%	86.0%	80.5%	81.4%	83.7%	83.7%	82.5%	80.3%	81.3%	81.0%	81.2%	80.9%	81.9%	81.6%	81.4%	81.1%	81.1%	81.0%	81.1%
MH024843.1	97.5%	97.9%	85.4%	85.6%	80.1%	81.1%	83.5%	83.5%	82.2%	80.0%	80.9%	80.8%	81.0%	80.6%	81.4%	81.2%	80.9%	80.7%	80.7%	80.6%	80.2%
MF498889.1	96.9%	97.9%	86.3%	86.2%	80.3%	81.5%	83.6%	83.6%	82.5%	80.1%	81.2%	81.0%	81.0%	80.8%	81.5%	81.5%	81.2%	80.9%	81.0%	80.9%	81.0%
NC_003397.1	85.6%	85.4%	86.3%	93.2%	81.4%	84.4%	82.8%	82.9%	85.6%	81.3%	82.0%	81.9%	82.2%	82.2%	82.4%	82.8%	82.6%	82.7%	82.7%	82.7%	82.7%
KC832501.1	86.0%	85.6%	86.2%	93.2%	81.6%	84.1%	83.1%	83.1%	85.0%	81.6%	82.8%	82.1%	82.5%	82.6%	83.0%	83.0%	83.2%	83.1%	83.0%	83.0%	82.9%
KJ508092.1	80.5%	80.1%	80.3%	81.4%	81.6%	85.2%	82.4%	82.5%	83.2%	83.6%	84.6%	84.0%	84.3%	84.4%	84.9%	84.8%	84.6%	84.5%	84.3%	84.3%	84.2%
MH795801.1	81.4%	81.1%	81.5%	84.4%	84.1%	85.2%	83.1%	83.1%	85.3%	84.0%	85.6%	84.7%	85.0%	85.3%	85.5%	85.3%	85.2%	85.1%	85.2%	85.1%	85.2%
MW019505.1	83.7%	83.5%	83.6%	82.8%	83.1%	82.4%	83.1%	99.9%	84.7%	83.8%	85.1%	84.6%	85.3%	85.1%	87.0%	87.1%	87.2%	87.7%	87.3%	87.3%	87.4%
MW019501.1	83.7%	83.5%	83.6%	82.9%	83.1%	82.5%	83.1%	99.9%	84.7%	83.8%	85.2%	84.6%	85.3%	85.2%	87.0%	87.1%	87.2%	87.7%	87.3%	87.3%	87.4%
KC832502.1	82.5%	82.2%	82.5%	85.6%	85.0%	83.2%	85.3%	84.7%	84.7%	84.7%	85.9%	88.1%	87.3%	86.5%	86.9%	86.9%	86.8%	87.6%	87.3%	87.5%	87.5%
KM076650.1	80.3%	80.0%	80.1%	81.3%	81.6%	83.6%	84.0%	83.8%	83.8%	84.7%	87.1%	87.1%	87.8%	87.4%	88.4%	88.3%	88.0%	88.4%	88.5%	88.6%	88.5%
KP903372.1	81.3%	80.9%	81.2%	82.0%	82.8%	84.6%	85.6%	85.1%	85.2%	85.9%	87.1%	87.9%	88.8%	89.6%	89.1%	89.1%	89.8%	89.1%	88.9%	89.2%	89.1%
LC582403.1	81.0%	80.8%	81.0%	81.9%	82.1%	84.0%	84.7%	84.6%	84.6%	88.1%	87.8%	87.9%	90.7%	89.5%	89.4%	89.3%	89.7%	90.5%	90.4%	90.6%	90.5%
MH024840.1	81.2%	81.0%	81.0%	82.2%	82.5%	84.3%	85.0%	85.3%	85.3%	87.3%	87.9%	88.8%	90.7%	94.8%	91.6%	91.8%	92.5%	94.6%	94.1%	94.5%	94.4%
MH024838.1	80.9%	80.6%	80.8%	82.2%	82.6%	84.4%	85.2%	85.1%	85.2%	86.5%	87.4%	89.6%	89.5%	94.8%	90.1%	90.1%	94.3%	92.3%	91.9%	92.2%	92.2%
MF498888.1	81.9%	81.4%	81.5%	82.4%	83.0%	84.9%	85.3%	87.0%	87.0%	86.9%	88.4%	89.1%	89.4%	91.6%	90.1%	92.2%	94.1%	93.8%	93.9%	93.8%	93.8%
MF498886.1	81.6%	81.2%	81.5%	82.7%	83.0%	84.8%	85.5%	87.1%	87.1%	86.9%	88.3%	89.1%	89.3%	91.8%	90.1%	96.6%	92.3%	94.3%	94.0%	94.3%	94.2%
MH024842.1	81.4%	80.9%	81.2%	82.8%	83.2%	84.6%	85.3%	87.2%	87.2%	86.8%	88.0%	89.8%	89.7%	92.5%	94.3%	92.2%	92.3%	95.1%	95.0%	95.5%	95.4%
KF114860.1	81.1%	80.7%	80.9%	82.6%	83.1%	84.5%	85.2%	87.7%	87.7%	87.6%	88.4%	89.1%	90.5%	94.6%	92.3%	94.1%	94.3%	95.1%	97.4%	97.6%	97.5%
EU761198.1	81.1%	80.7%	81.0%	82.7%	83.0%	84.3%	85.1%	87.3%	87.3%	87.3%	88.5%	88.9%	90.4%	94.1%	91.9%	93.8%	94.0%	95.0%	97.4%	98.0%	98.0%
MH024841.1	81.0%	80.6%	80.9%	82.7%	83.0%	84.3%	85.2%	87.3%	87.3%	87.5%	88.6%	89.2%	90.6%	94.5%	92.2%	93.9%	94.3%	95.5%	97.6%	98.0%	99.4%
MH024839.1	81.1%	80.7%	81.0%	82.7%	82.9%	84.2%	85.2%	87.4%	87.4%	87.5%	88.5%	89.1%	90.5%	94.4%	92.2%	93.8%	94.2%	95.4%	97.5%	98.0%	99.4%

<그림 1-66> Homology distance of BCMV isolates.



<그림 1-67> Phylogenic tree of BCMV genes.



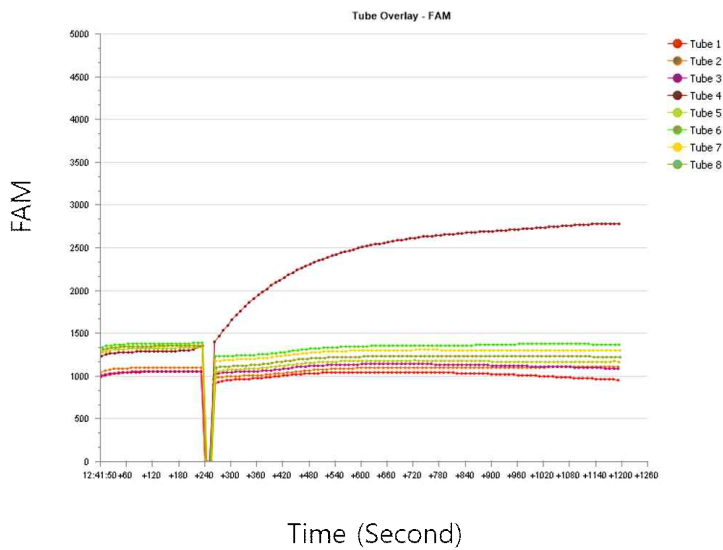
<그림 1-68> Candidate primer and probe sets of BCMV.

1. BCMV4-CP- 675 F:
5'- TCTTXXXTTAGATCAXXXTTGGATXXXAAGCC - 3'

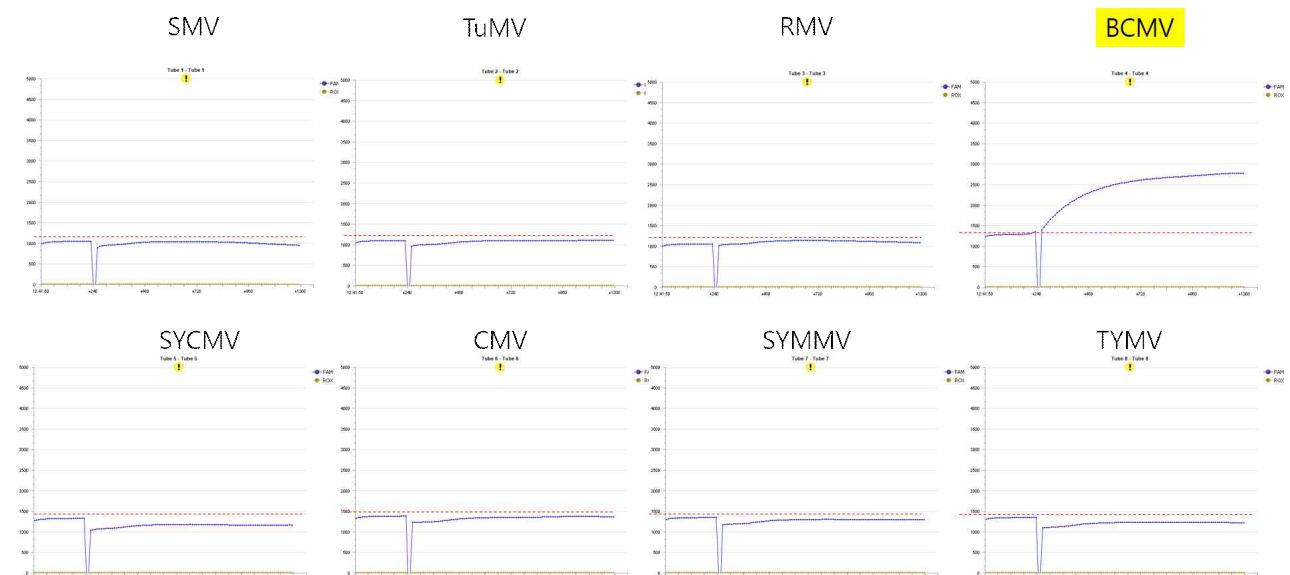
2. BCMV4-CP- 714 P:
5'- TAT XXX ATT ACA XXX CAG AAC AAA XXX ATC [FAM-dT] T [THF] T
[BHQ1-dT] AAC ACA XXX GCA ACA XXX -C3 Spacer

3. BCMV4-CP- 822 R:
5'- TTCXXXACAAXXXACATCTGATCAXXTCTATCTC -3'

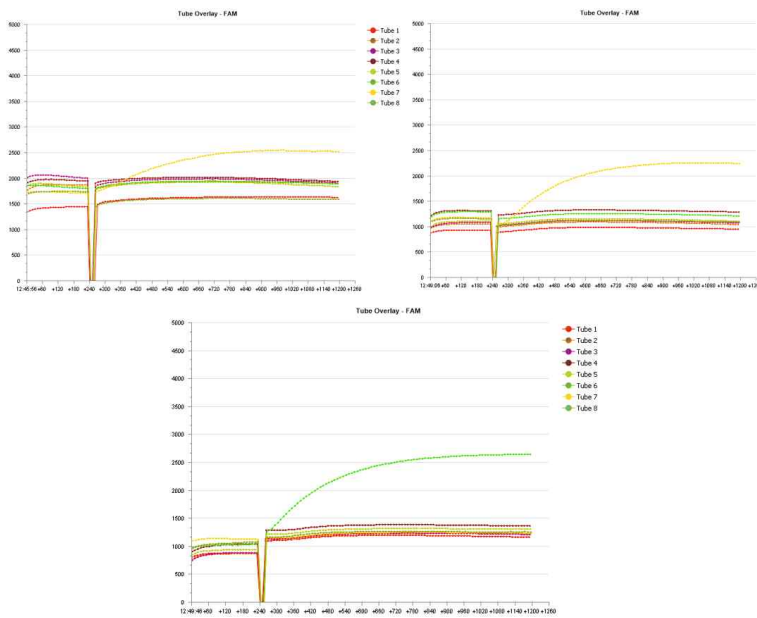
<그림 1-69> RPA exo primer & probe set of BCMV isolates.



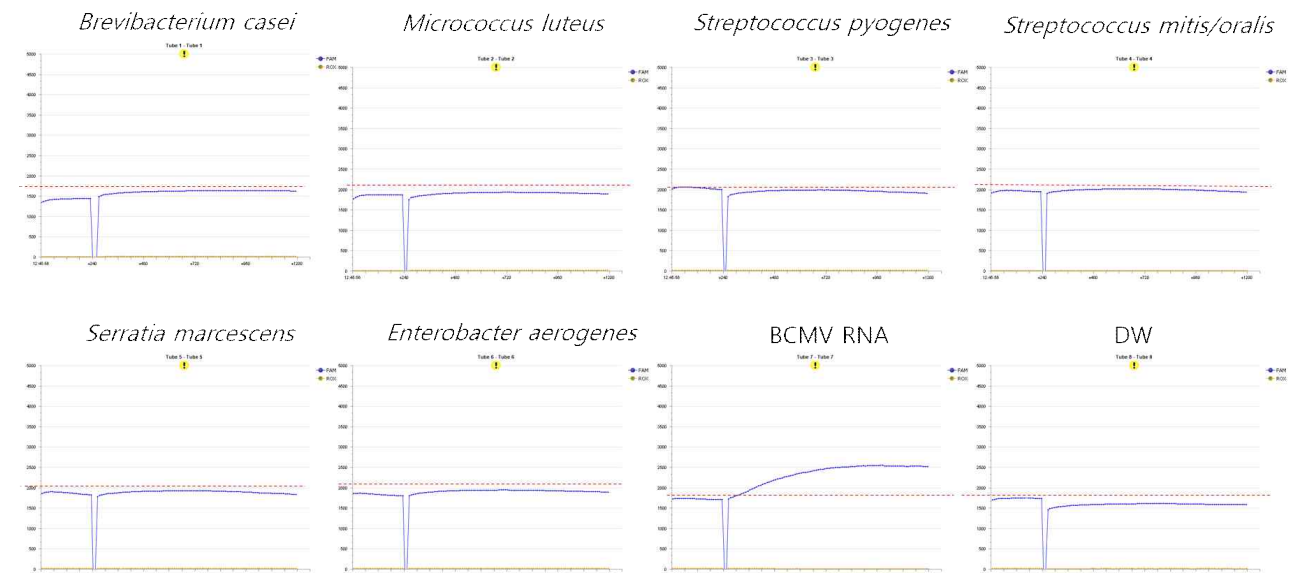
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCMV4-675 F	0.7 ul
BCMV4-822 R	0.7 ul
BCMV4-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul

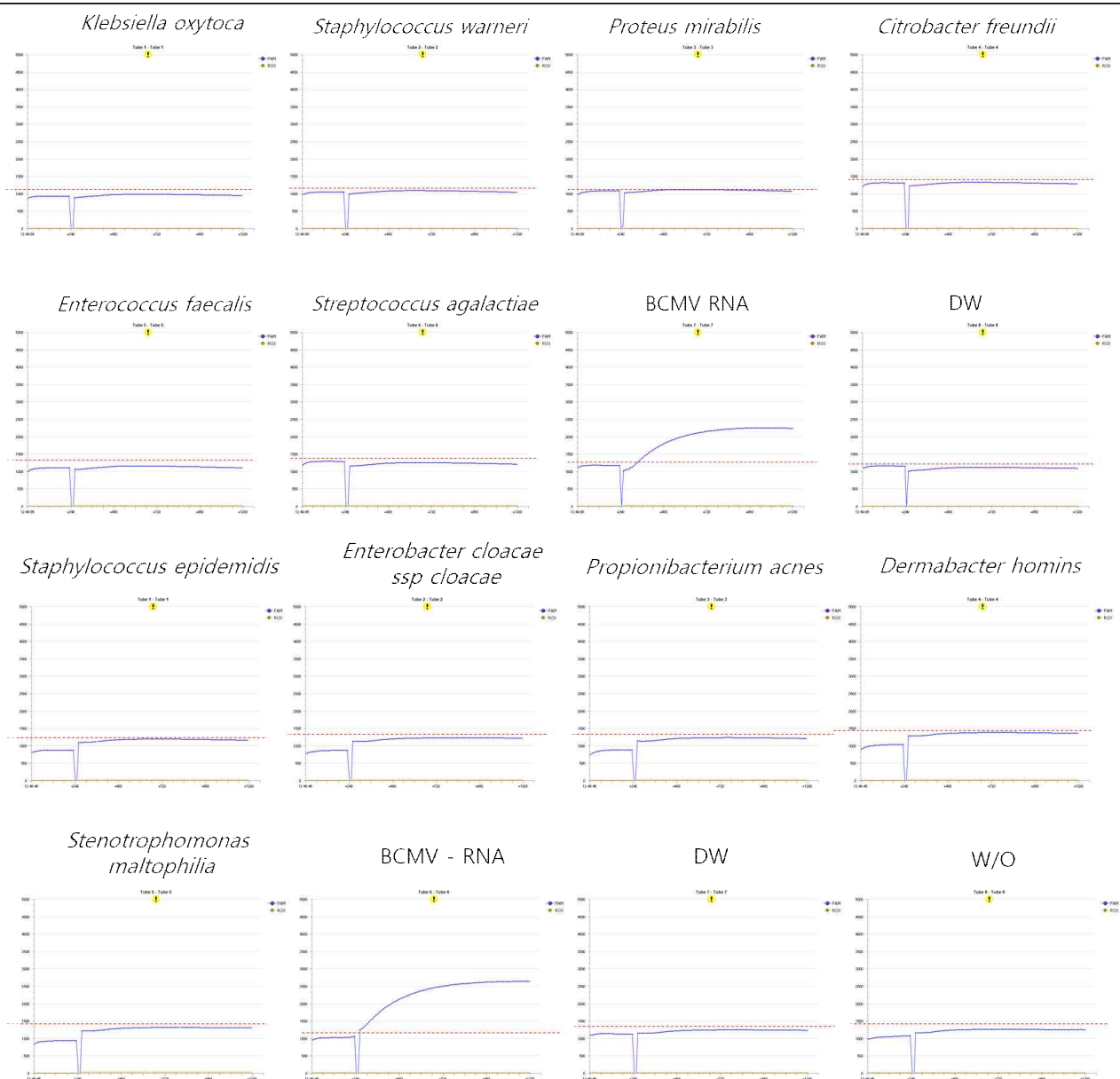


<그림 1-70> Reaction composition of RPA and specificity of BCMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCM4-675 F	0.7 ul
BCM4-822 R	0.7 ul
BCM4-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul





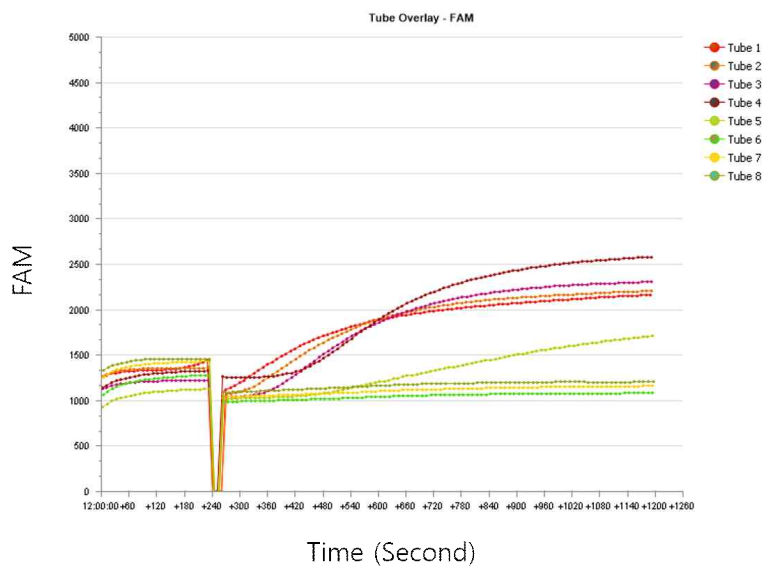
<그림 1-71> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of BCMV with several bacteria.

```

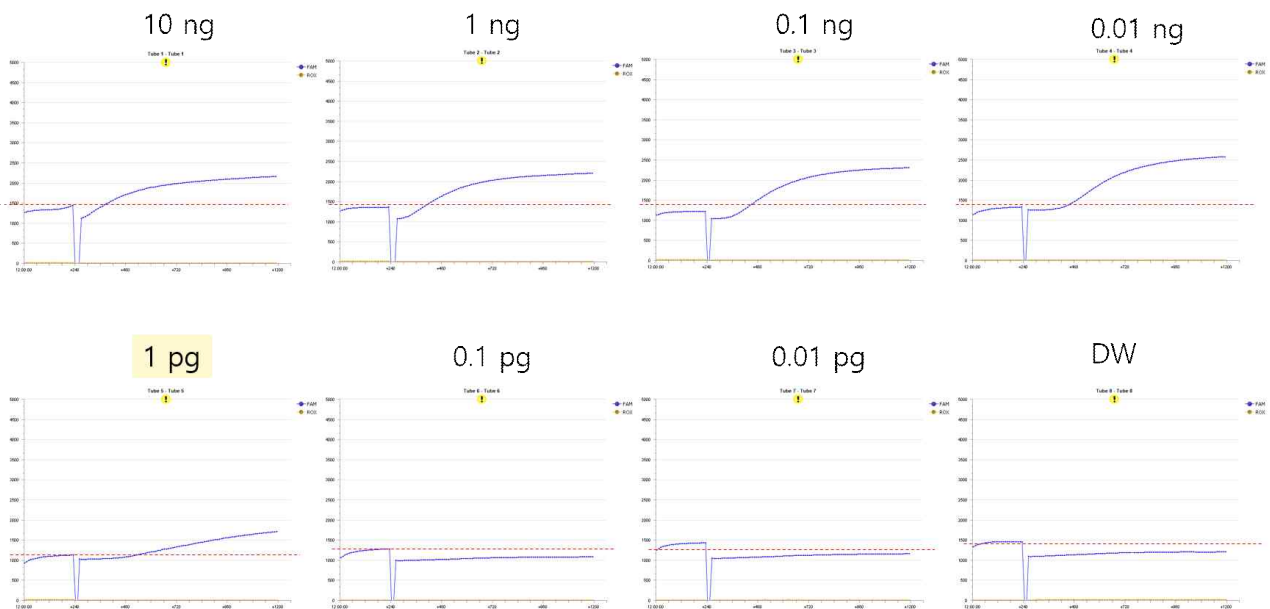
TGTGATXXXXXAATTTAGATCATXXXXTTGGATTACAAGCCAG
AACAAACTGATCTTTTAAACACAAGAGCAACAAAGATGCAG
TTTGAAATGTGGTACAATXXXXXXXXXXGGCTGAGTATGAGATA
GATGATGATCAGATGTCAATTGXXXXXXXXAACGGC

```

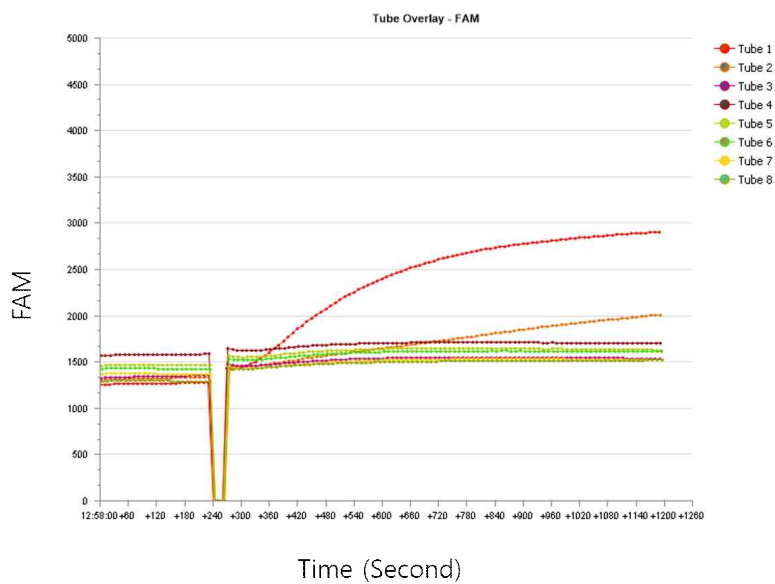
<그림 1-72> Synthetic target gene of BCMV primer set.



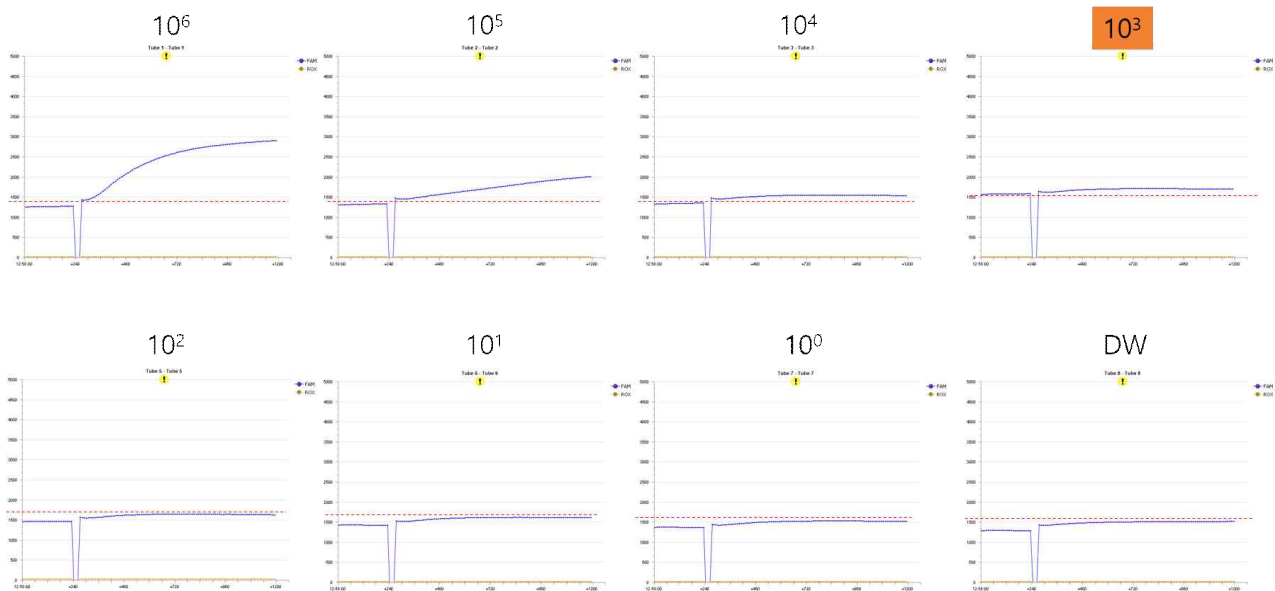
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM New dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCMV4-675 F	0.7 ul
BCMV4-822 R	0.7 ul
BCMV4-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul



<그림 1-73> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of BCMV (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM New dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCM4-675 F	0.7 ul
BCM4-822 R	0.7 ul
BCM4-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul



<그림 1-74> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of BCMV (copies/ul).

- BCMV 유전자 22건에 대한 유전자를 분석한 결과 2개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-66, 67).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, BCMV gene의 중간부분에서 여러 개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; BCMV4-CP-675F, BCMV4-CP-714P, BCMV4-CP-822R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-68, 69).
- RPA Exo kit를 사용하여 8가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, BCMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-70).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-71).
- BCMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-72).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-73).
- 목표유전자를 10⁶ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1000 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-74).
- 이상의 결과로 RT-RPA BCMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-75).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-76).
- BCMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠싸이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-77).



<그림 1-75> BCMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-BCMV-ER-50

Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-BCMV-ER-0001
Issue Date: Jul 24, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
Tel: +82-02-1588-3546 www.ynglobalwavework.kr nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggido South Korea.
Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of BCMV gene to detect the BCMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Bean common mosaic virus (BCMV) is BCMV host range is limited but naturally infected plants include common bean, *Phaseolus vulgaris* L. var. aborigineus, *Rhynchosia minima* (L.) DC, and some wild tropical *Phaseolus* spp. Symptoms include light and dark green mosaic patterns on trifoliate leaves. Other symptoms include: puckering, blistering, distortion, downward curling and rolling, and a mild or severe green-on green mosaic mottle. Pinpoint, yellow dots or necrotic local lesions may often result in plant growth reduction. Plants infected at a young age may be stunted and distorted. This virus is spread between production areas and between seasons, especially in infected seed. The most important vectors are aphids, but also pollen, and mechanical transmission.



<Map of distribution>

The Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Bean common mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the BCMV gene for the unique amplification of Bean common mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	BCMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	BCMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	BCMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	BCMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	BCMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	BCMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	BCMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

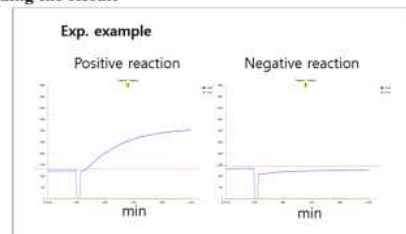
- * Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.
- * Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - * It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

- Plate setup
 - Set the fluorophores with FAM.
 - Type the sample names in the each tube.
 - * Unknown: clinical sample
 - * Negative control
 - * Positive control

8. Reading the Result



<Example of BCMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	BCMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	BCMV Positive
2	+	-	-	BCMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
SCIENTIFIC SOLUTIONS

Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection Kit

Bean common mosaic virus (BCMV) 강남콩 일반 모자이크 바이러스



본 제품은 1회용 검사용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다. 본 제품은 1회용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다. 본 제품은 1회용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다.

본 제품은 1회용 검사용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다. 본 제품은 1회용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다. 본 제품은 1회용 검사관을 사용하여 간편하게 검사할 수 있는 신속검출 키트를 제공합니다.

Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection Kit는 감염된 작물로 부터 BCMV를 검출하여 정량분석하는 연구용 제품입니다.

LCM SCIENCE
SCIENTIFIC SOLUTIONS

사용 목적

Bean common mosaic virus (BCMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd. 에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 BCMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- 20분내 빠른 검사 결과 확인
- 간편한 사용법
- 빠른 시간대비 높은 민감도
- 사용지를 위한 동등성 제공 (준비중)

LCM SCIENCE
SCIENTIFIC SOLUTIONS

제품 스펙

검체	BCMV 감염 의심 식물
검사시간	15-20분 (핵심추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

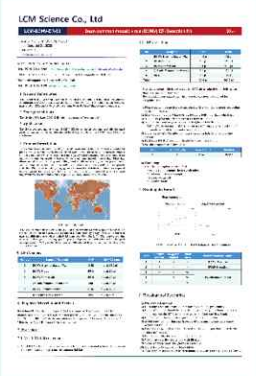
주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-BCMV-ER-50	Bean common mosaic virus (BCMV) ER- Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

LCM SCIENCE
SCIENTIFIC SOLUTIONS

제품설명서

LCM Science Co., Ltd
1234567890101112131415161718192021222324252627282930313233343536373839404142434445464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384858687888990919293949596979899100



LCM SCIENCE
SCIENTIFIC SOLUTIONS

<그림 1-77> Contents of BCMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ BCMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. BCMV4nfo-675 F:

5'- TCTTXXXTT TAGATCXXXXTATTGGATXXXAAGCC - 3'

2. BCMV4nfo-714 P:

5'- [FAM] TAT XXX ATT ACA XXX CAG AAC AAA CTG ATC TT [THF] T
T AAC XXX AGA GCA XXX AAG -C3 Spacer

3. BCMV4nfo-822 R:

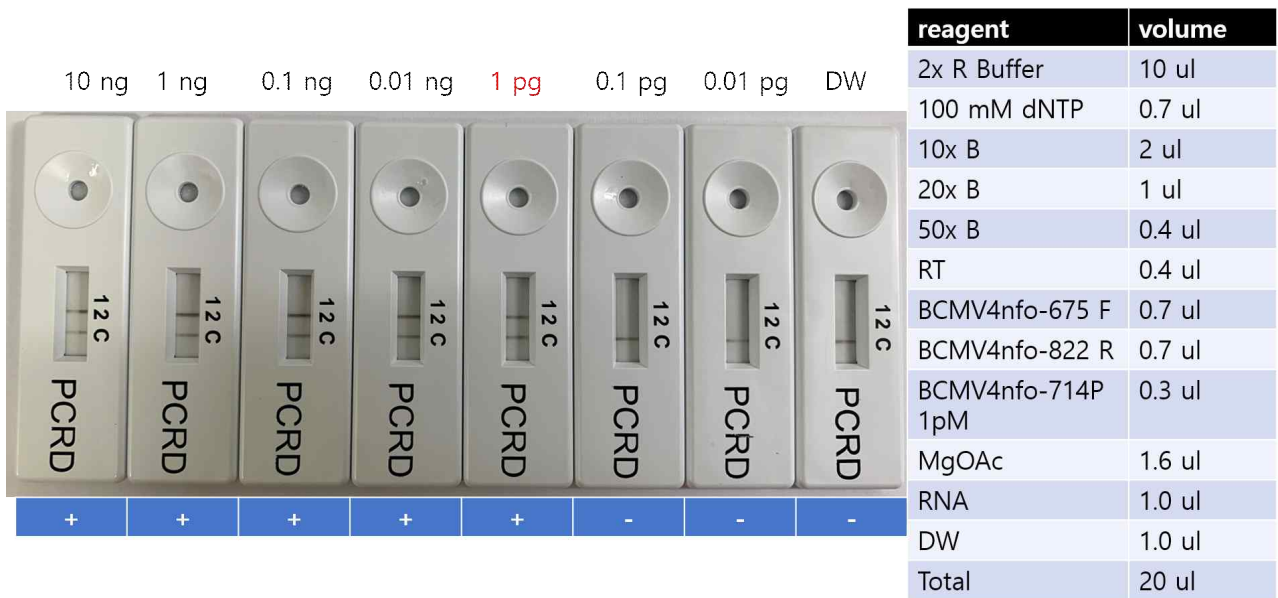
5'- [Biotin] TTCXXXACAATTGACXXXTGATCATCAXXXTATCTC -3'

<그림 1-78> RT-RPA nfo primer probe set of BCMV.

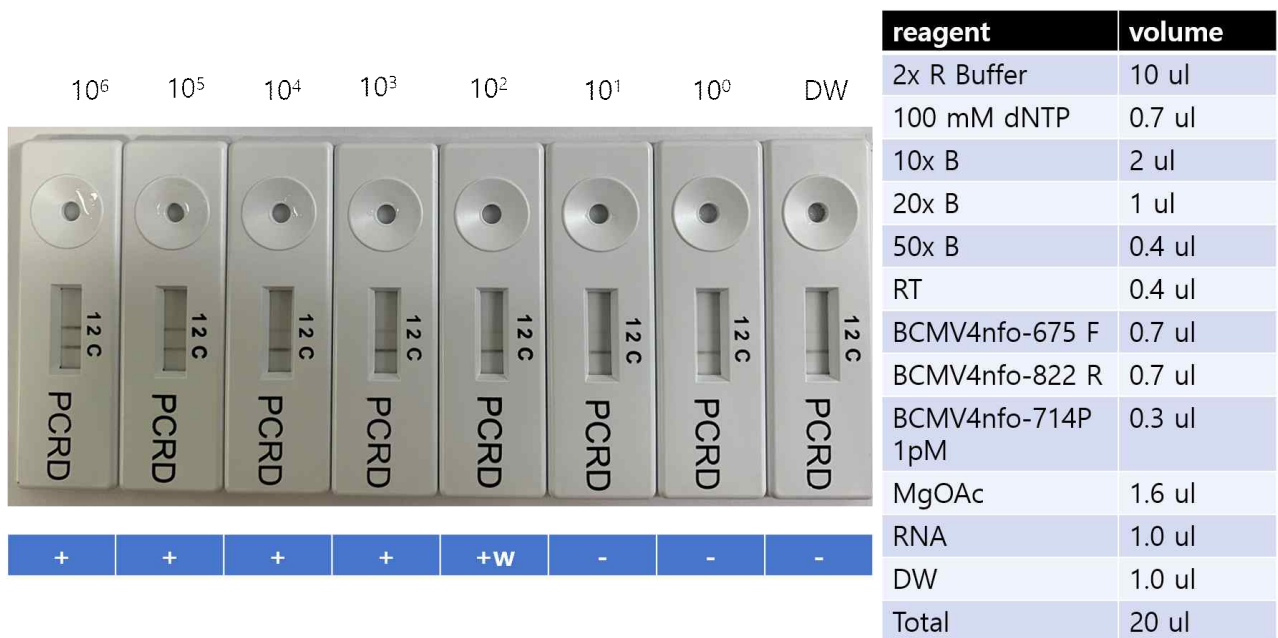


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCMV4nfo-675 F	0.7 ul
BCMV4nfo-822 R	0.7 ul
BCMV4nfo-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul


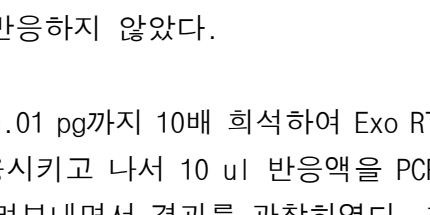
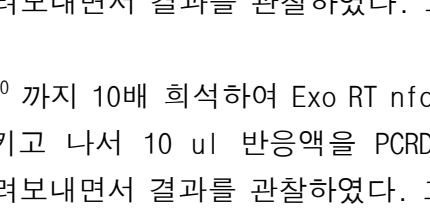

<그림 1-79> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of BCMVnfo primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip Yellow Mosaic virus. DW; Distilled Water.



<그림 1-80> Sensitivity of BCMVnfo primer and probe (concentration).



<그림 1-81> Sensitivity of BCMVnfo primer and probe (copies/ul).

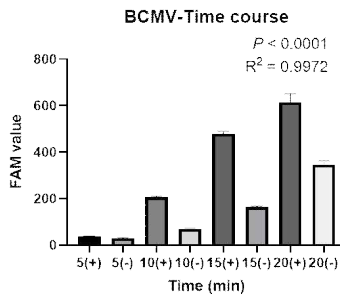
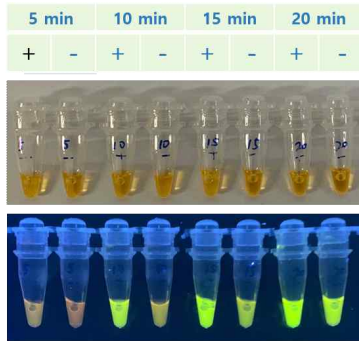
reagent	volume	1	2	3	4	5	6	+	-	
2x R Buffer	10 ul									
100 mM dNTP	0.7 ul									
10x B	2 ul									
20x B	1 ul									
50x B	0.4 ul									
RT	0.4 ul									
BCMV4nfo-675 F	0.7 ul									
BCMV4nfo-822 R	0.7 ul									
BCMV4nfo-714P 1pM	0.3 ul									
MgOAc	1.6 ul									
RNA	1.0 ul									
DW	1.0 ul									
Total	20 ul									

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	BCMV4-CP DNA	Positive

<그림 1-82> Specificity of BCMVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT BCMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-78).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-79과 같이 nfo primer probe는 BCMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 1 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-80).
- 목표유전자를 10⁵ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 100 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-81).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-82).

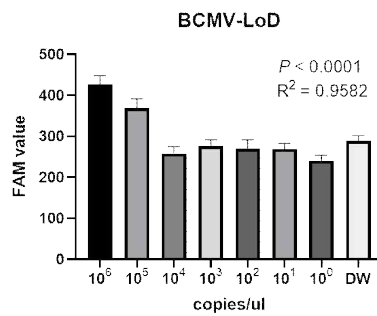
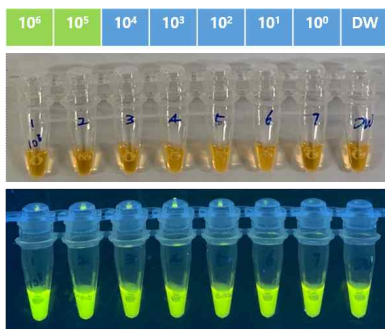
■ BCMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
BCMV4nfo-675 F	0.7 ul
BCMV4nfo-822 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	38	28	209	72	471	161	640	358
	40	31	204	67	487	166	588	333

<그림 1-83> RPA end point reaction with primer set of BCMV according to the time.

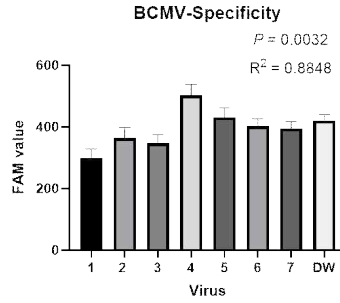
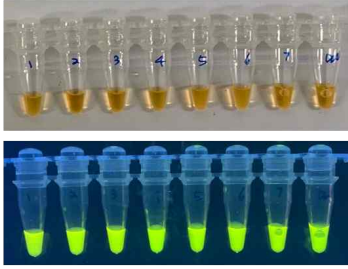


Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
BCMV4nfo-675 F	0.7 ul
BCMV4nfo-822 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	442	385	270	287	285	279	250	298
	412	352	246	265	255	259	231	281

<그림 1-84> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of BCMV.

1 2 3 4 5 6 7 8



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
BCMV4nfo-675 F	0.7 ul
BCMV4nfo-822 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

No	1	2	3	4	5	6	7	8
Virus	SYCMV SYMMV	TuMV	RMV	BCMV	SMV/ SYMMV	CMV	TYMV	DW
FAM	320 277	388 339	366 327	527 476	453 408	419 384	410 378	434 405

<그림 1-85> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of BCMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

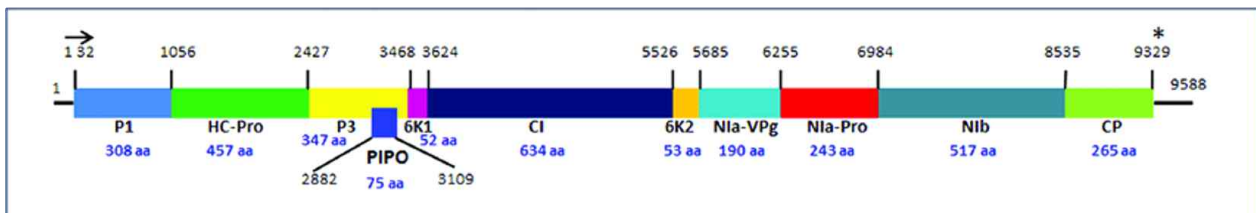
- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT BCMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39℃에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분 후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-83).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39℃에서 20분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^5 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-84).
- 그림 1-85와 같이 종간 특이도를 분석한 결과, nfo primer probe는 BCMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-85).

5. Soybean mosaic virus (SMV) - RPA probe 진단제 개발

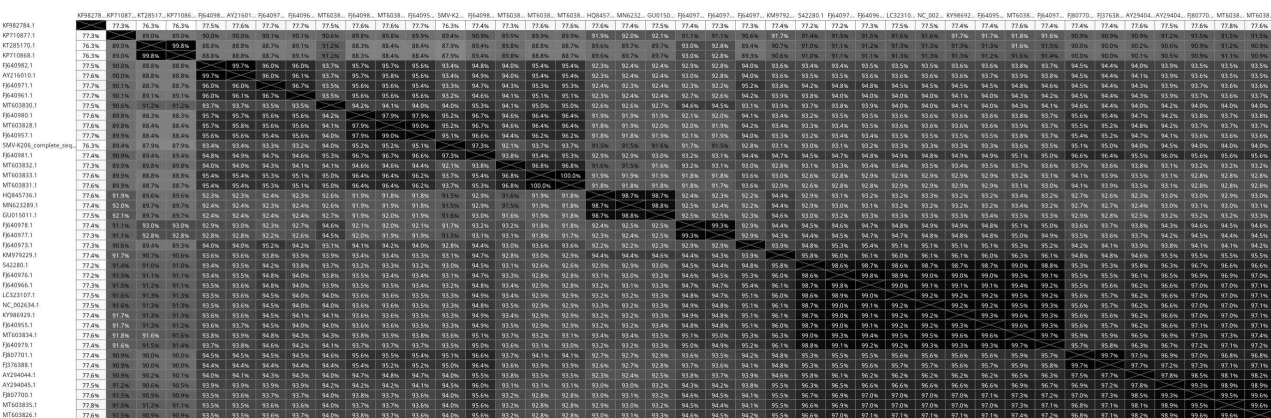
■ 주관연구기관- (주) 엘씨엠씨아연스 연구결과

- 대두 모자이크 바이러스(SMV)는 식물 바이러스 속 포티바이러스스(Potyviridae 계통)의 구성원입니다. 주로 파바세아과에 속하는 식물을 감염시키지만 다른 경제적으로 중요한 작물도 감염시키는 것으로 밝혀졌습니다. SMV는 전 세계 대두 생산지에서 발생하는 대두 모자이크병의 원인입니다. 대두(글리신 맥스)는 식용 오일과 단백질의 가장 중요한 공급원 중 하나이며 병원성 감염은 미국에서 연간 약 40억 달러의 수확량 손실을 초래합니다. 이러한 병원체 중 SMV는 전 세계적으로 대두 생산에서 가장 중요하고 널리 퍼진 바이러스 병원체입니다. 이로 인해 약 8~35%의 수율 감소가 발생하지만 최대 94%의 손실이 보고되었습니다.

이 바이러스는 1915년 코네티컷에서 처음 보고되었으며 1921년에 기술되었습니다. 이 바이러스의 게놈은 최소 11개의 단백질을 인코딩하는 약 9.5kb의 단일 가닥 양성 센스 RNA입니다. SMV 비리온은 길이가 약 720~800nm이고 직경이 12~15nm인 비피막, 굴곡성, 사상체입니다. SMV의 여러 균주는 9,588개 뉴클레오티드로 구성된 완전히 시퀀싱되었습니다 (시퀀싱된 데이터는 GenBank에서 찾을 수 있음)(https://en.wikipedia.org/wiki/Soybean_mosaic_virus).



<그림 1-86> Genetic map and symptom of SMV.



<그림 1-87> Homology distance of SMV isolates.

1. SMV-3,297 F:

5'-TTTGTXXXXTGAATGACAAATTXXXXTGGCATA - 3'

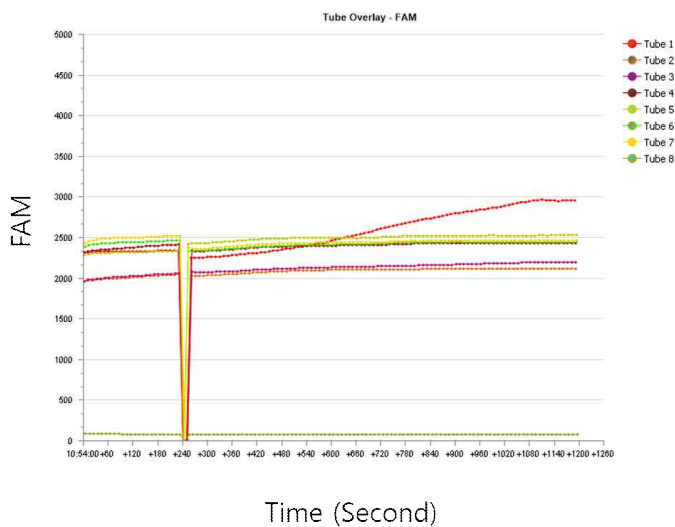
2. SMV-3,524 P:

5'- AGT XXX ACC TAA XXX ATG TAA GAA XXX CAC [FAM-dT] T [THF] T
[BHQ1-dT] CAA AAA XXX GAC CAG -3' Spacer C

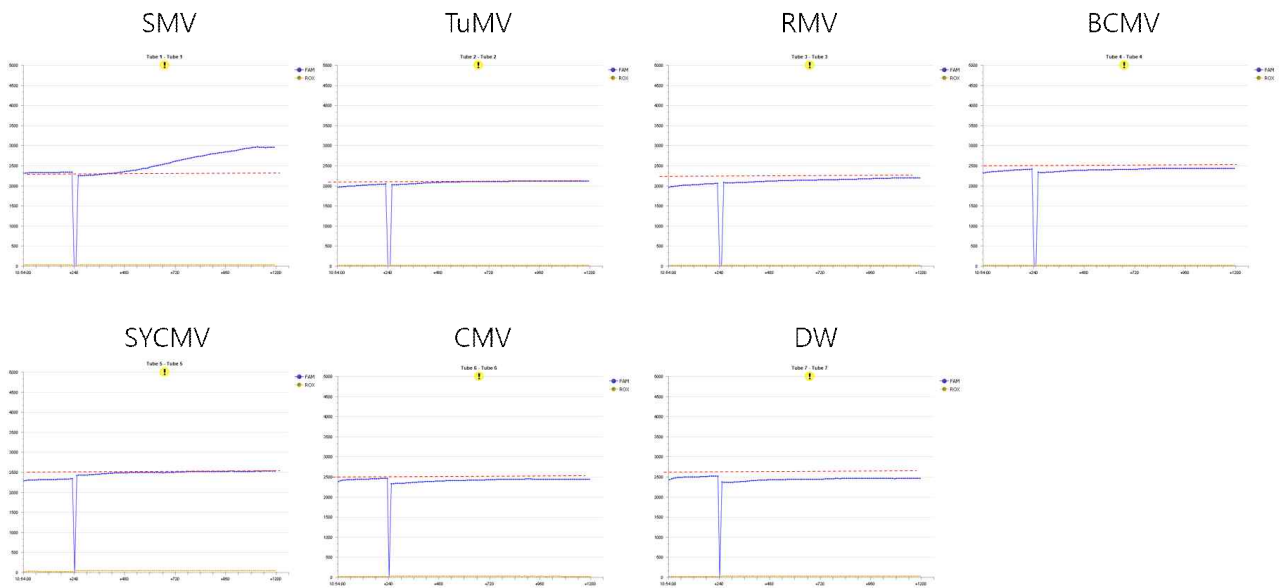
3. SMV- 3,665 R:

5'-GATTATXXXXATGTTCCACCAGXXXXAAACTATATCAC-3'

<그림 1-90> RPA exo primer & probe set of SMV isolates.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.8 ul
SMV 3297F	0.7 ul
SMV 3665R	0.7 ul
SMV 3524P 1pM	0.4 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	0.7 ul
Total	20 ul

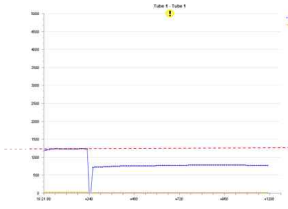


<그림 1-91> Reaction composition of RPA and specificity of SMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, DW; Distilled water.

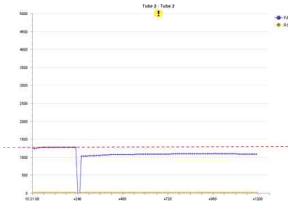
reagent	volume	
2x R Buffer	10 ul	80 ul
100 mM dNTP	0.7 ul	5.6 ul
10x B	2 ul	16 ul
20x B	1 ul	8 ul
50x B	0.4 ul	3.2 ul
RT	0.4 ul	3.2 ul
SMV 3297F	0.7 ul	5.6 ul
SMV 3665R	0.7 ul	5.6 ul
SMV 3524P 1pM	0.3 ul	2.4 ul
MgOAc	1.6 ul	12.8 ul
RNA	1.0 ul	1.0 ul
DW	1.2 ul	9.6 ul
Total	20 ul	

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	SMV DNA	Positive

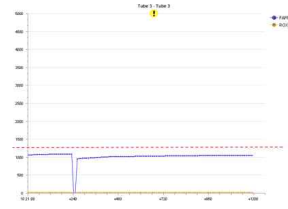
Brevibacterium casei



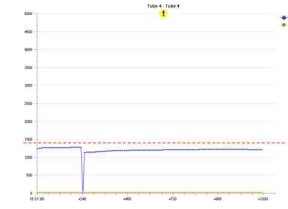
Micrococcus luteus



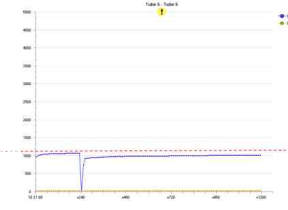
Streptococcus pyogenes



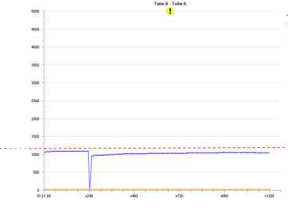
Streptococcus mitis/oralis



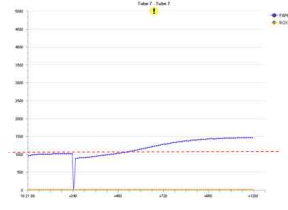
Serratia marcescens



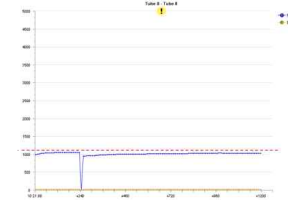
Enterobacter aerogenes



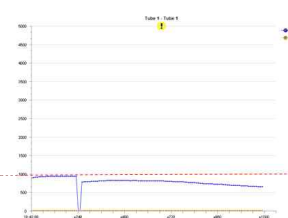
+ control of SMV



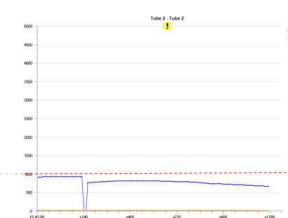
DW



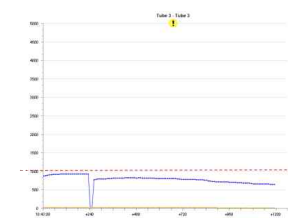
Klebsiella oxytoca



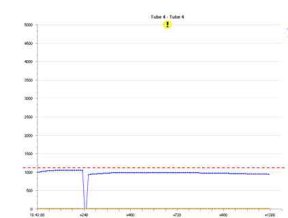
Staphylococcus warneri



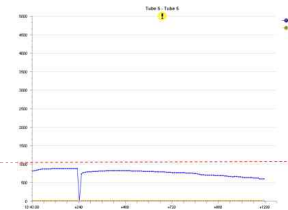
Proteus mirabilis



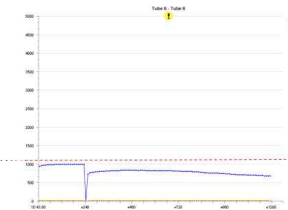
Citrobacter freundii



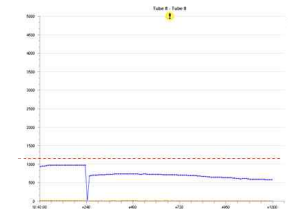
Enterococcus faecalis



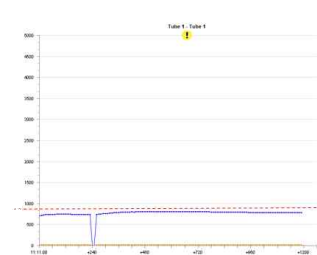
Streptococcus agalactiae



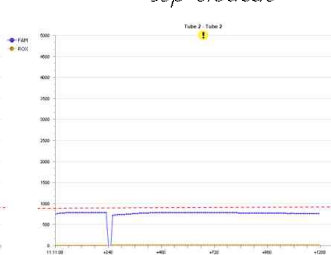
DW



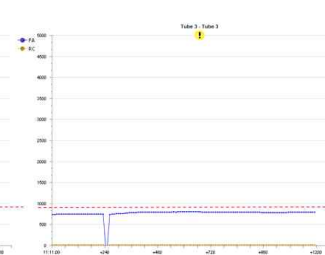
Staphylococcus epidermidis



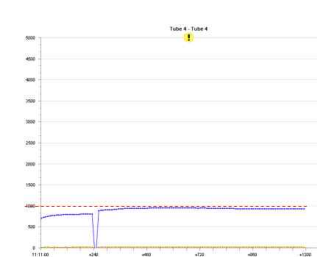
Enterobacter cloacae
ssp cloacae



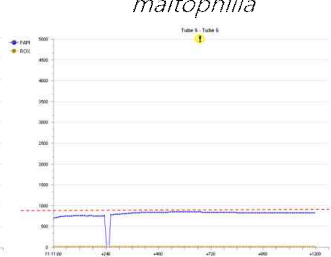
Propionibacterium acnes



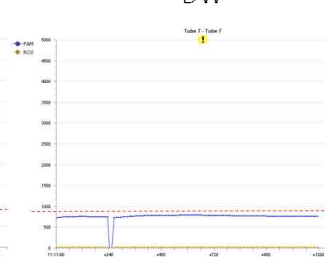
Dermabacter hominis



Stenotrophomonas
maltophilia



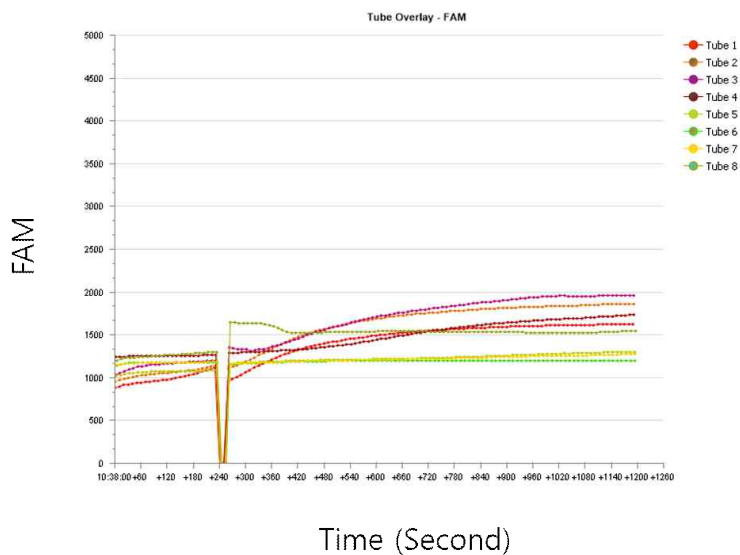
DW



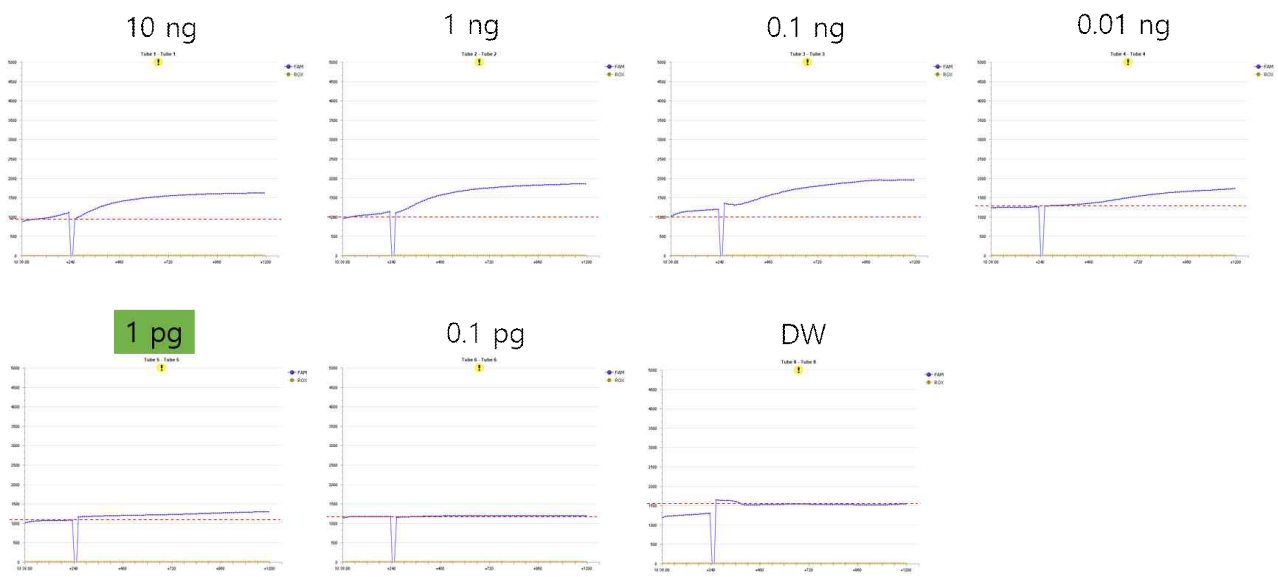
<그림 1-92> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of SMV with several bacteria.

TGGTTTTGTAGXXXXXAATGACAAATTGTATATGGCATATGAA
 AAAATCTACTCAGATCGCTTGAAGCAGGAATGGCGCGCATT
 AAGCTGGTTGGAAAAATTTTCTATAACATGGCAATTGAAAAG
 ATTTGCTCCACATACGXXXXXXXXXAATGTTTGACAAAGAAAGT
 TGTAGAAGAAAGCAGCGCATCTTCAGGAAACTTTGCGAGTG
 TGTGCTTCATGAATGCCCXXXXXXXXCACCTAAGAAATGTAAGA
 AATACACTTTTCCAAAAATGTGACCAGGTTTGGACTGCATCG
 GTGCGAGCCTTTGTGAGGTXXXXXXXXXXATTTCAACACTTCA
 CAGGTGCTACAGTGATATAGTTTXXXTGAACATCTGTATAAT
 CTTTTCATTGCTTG

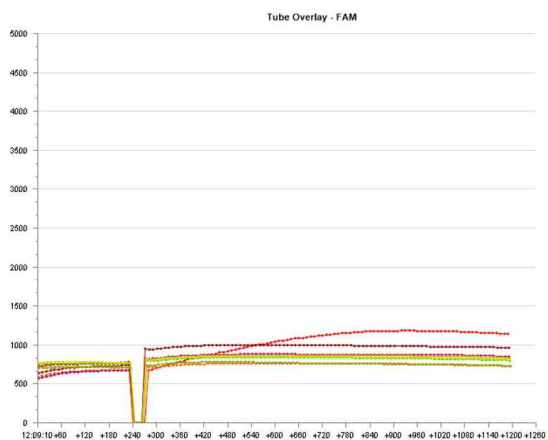
<그림 1-93> Synthetic target gene of SMV primer set.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMV 3297F	0.7 ul
SMV 3665R	0.7 ul
SMV 3524P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

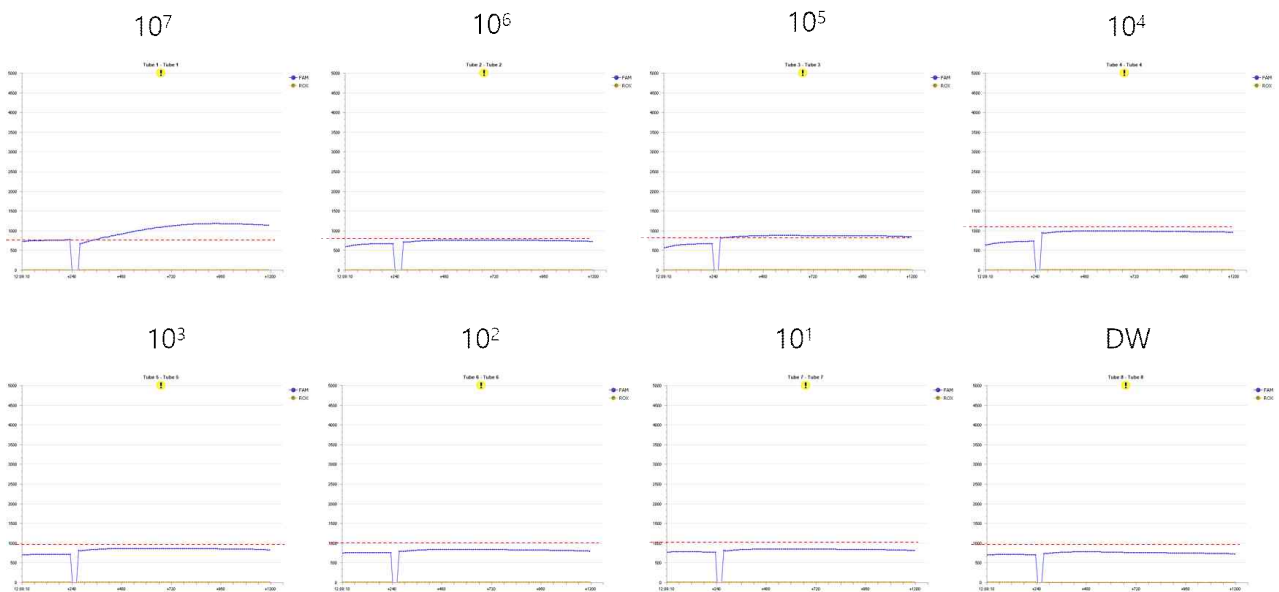


<그림 1-94> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SMV (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMV 3297F	0.7 ul
SMV 3665R	0.7 ul
SMV 3524P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
DNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	DW
+	-	-	-	-	-	-	-



<그림 1-95> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SMV (copies/ul).

- SMV 유전자 40건에 대한 유전자를 분석한 결과 3개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-87, 88).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, SMV gene의 중간부분에서 여러 개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; SMV-3297F, SMV-3524P, SMV-3665R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-89, 90).
- RPA Exo kit를 사용하여 8가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, SMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-91).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-92).
- SYMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-93).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-94).
- 목표유전자를 10⁷ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 10⁷ copies/ul 만 반응을 하였다 (그림 1-95).
- 이상의 결과로 RT-RPA SMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-96).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-97).
- TYMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠씨아이언스의 홈페이지에 게재하

여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-98).



<그림 1-96> SMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-SMV-ER-50

Soybean mosaic virus (SMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-SMV-ER-0001
Issue Date: Jul 24, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.vuglobal.wavework.kr_nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggi-do South Korea.

Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Soybean mosaic virus (SMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of SMV gene to detect the SMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Soybean mosaic virus (SMV) is a member of the plant virus genus Potyvirus (family Potyviridae). It infects mainly plants belonging to the family Fabaceae but has also been found infecting other economically important crops. SMV is the cause of soybean mosaic disease that occurs in all the soybean production areas of the world. Soybean (Glycine max) is one of the most important sources of edible oil and proteins and pathogenic infections are responsible for annual yield losses of about \$4 billion in the United States. Among these pathogens, SMV is the most important and prevalent viral pathogen in soybean production worldwide. It causes yield reductions of about 8% to 35% but losses as high as 94% have been reported.

The virus was first reported from Connecticut in 1915 and described in 1921. Its genome is a single stranded positive sense RNA of about 9.5kb that encodes at least 11 proteins. SMV virion is non envelope, flexuous, filamentous of about 720-800 nm long and 12-15 nm in diameter. Several strains of the SMV have been fully sequenced, consisting of 9,588 nucleotides (the sequenced data can be found on GenBank).

The Soybean mosaic virus (SMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Soybean mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the SMV gene for the unique amplification of Soybean mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	SMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	SMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	SMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	SMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	SMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	SMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	SMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

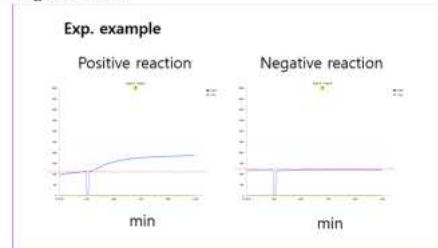
- Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.
- Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

- Plate setup
 - Set the fluorophores with FAM.
 - Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of SMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	SMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	SMV Positive
2	+	-	-	SMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER

<그림 1-97> Insert of SMV ER Detection kit.



LCM SCIENCE

사용 목적

Soybean mosaic virus (SMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 SMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE

제품 스펙

검체	SMV 감염의식 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-SMV-ER-50	Soybean mosaic virus (SMV) ER - Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

LCM SCIENCE

제품설명서

LCM SCIENCE

<그림 1-98> Contents of SMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ SMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. SMVnfo-3,297 F:

5'-TTXXXAGATATGAATXXXXAATTGTATXXXXCATA - 3'

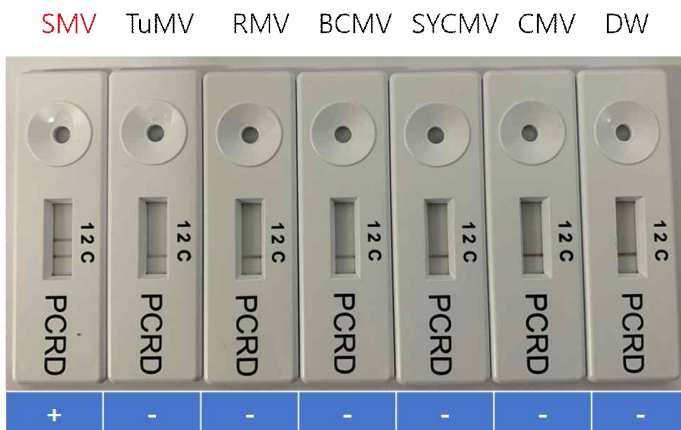
2. SMVnfo-3,524 P:

5'- [FAM] AGT CAC XXX TAA GAA ATG XXX GAA ATA XXX T [THF] T
T CAA XXX TGT XXX CAG -3' Spacer C

3. SMVnfo- 3,665 R:

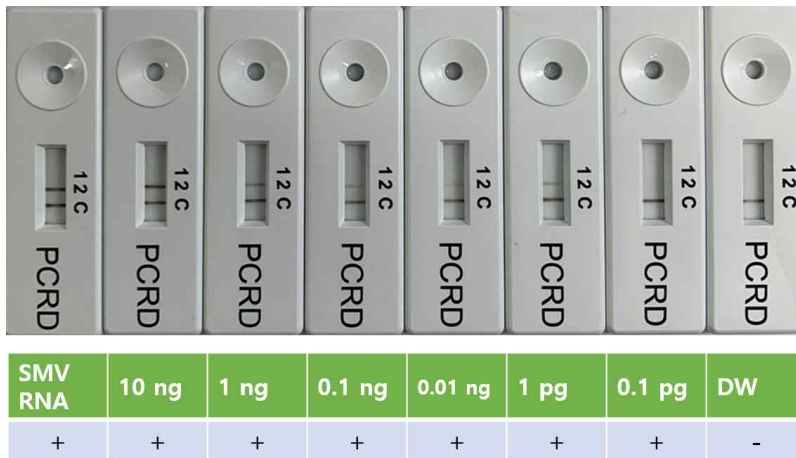
5'- [Biotin] GA TTA XXX AGA TGT TCA XXX GAT AAA XXX TAT CAC-3'

<그림 1-99> RT-RPA nfo primer probe set of SMV.



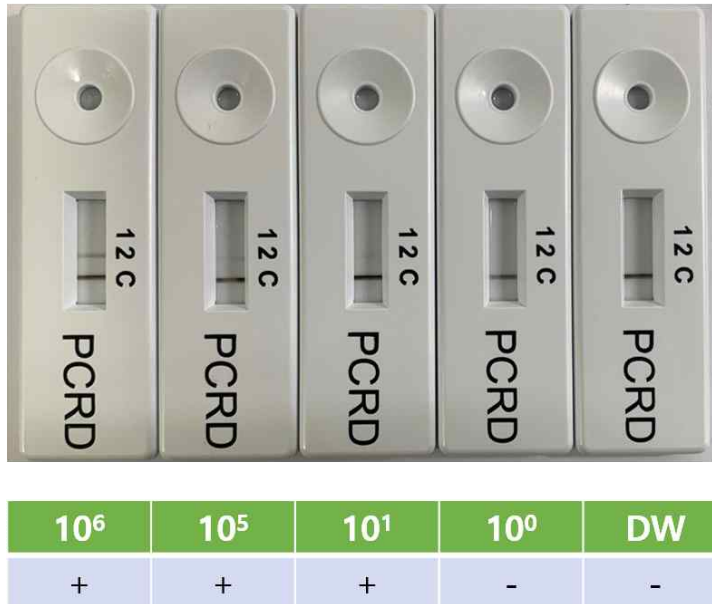
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMVnfo-3,297 F	0.8 ul
SMVnfo 3665R	0.8 ul
SMVnfo-3,524 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul

<그림 1-100> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of SMVnfo primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, DW, Distilled water.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMVnfo-3,297 F	0.7 ul
SMVnfo 3665R	0.7 ul
SMVnfo-3,524 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

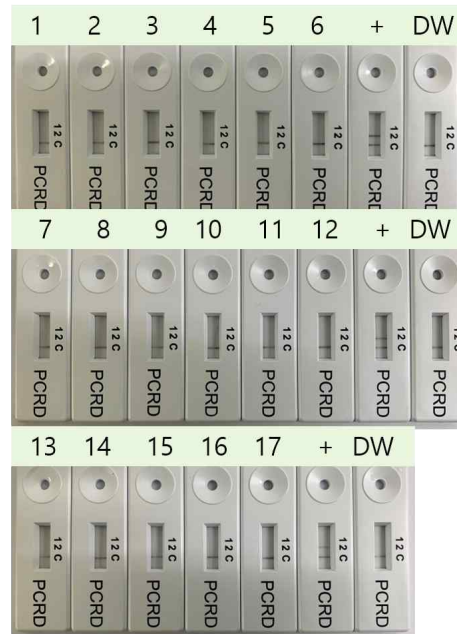
<그림 1-101> Sensitivity of SMVnfo primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMVnfo-3,297 F	0.7 ul
SMVnfo 3665R	0.7 ul
SMVnfo-3,524 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-102> Sensitivity of SMVnfo primer and probe (copies/ul).

reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SMVnfo-3,297 F	0.7 ul
SMVnfo 3665R	0.7 ul
SMVnfo-3,524 P	0.3 ul
10 pM	
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



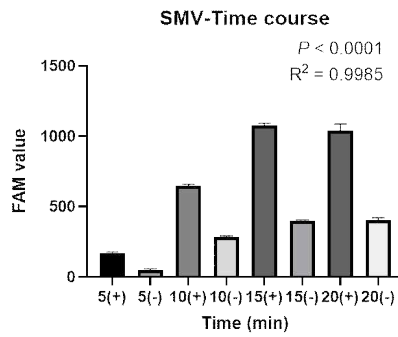
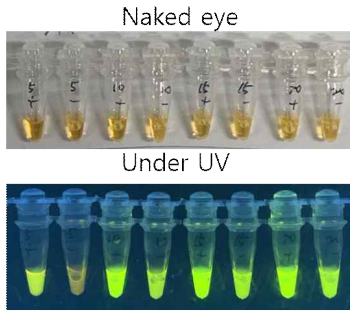
No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	SMV - mRNA transcript	Positive

<그림 1-103> Specificity of SMVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT SMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-99).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-100과 같이 nfo primer probe는 SMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.1 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-101).
- 목표유전자를 10⁶ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 10 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-102).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-103).

■ SMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과

5 min		10 min		15 min		20 min	
+	-	+	-	+	-	+	-

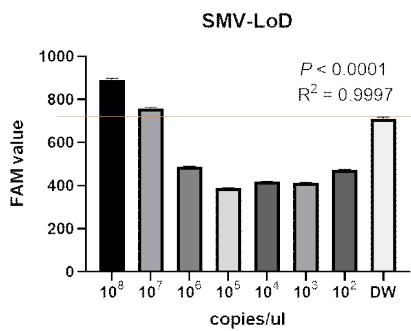
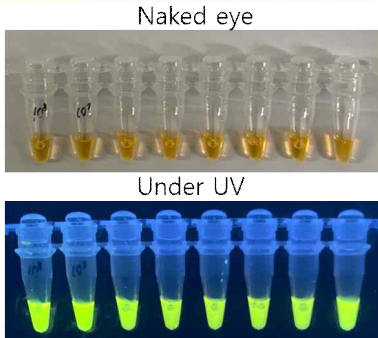


Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SMVnfo-3,297 F	0.8 ul
SMVnfo 3665R	0.8 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.3 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	175	55	656	289	1088	404	1073	416
	162	44	638	278	1066	397	1008	394

<그림 1-104> RPA end point reaction with primer set of SMV according to the time.

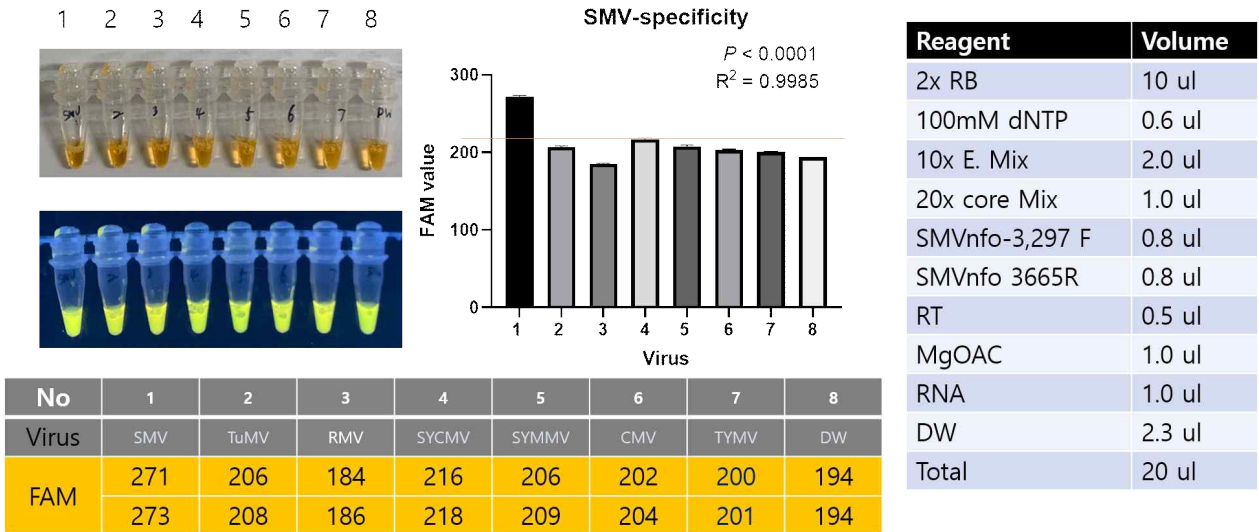
10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	DW
-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	----



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SMVnfo-3,297 F	0.8 ul
SMVnfo 3665R	0.8 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.3 ul
Total	20 ul

LoD	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	DW
FAM	887	756	486	389	416	413	473	706
	896	763	490	391	419	415	476	716

<그림 1-105> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of SMV.



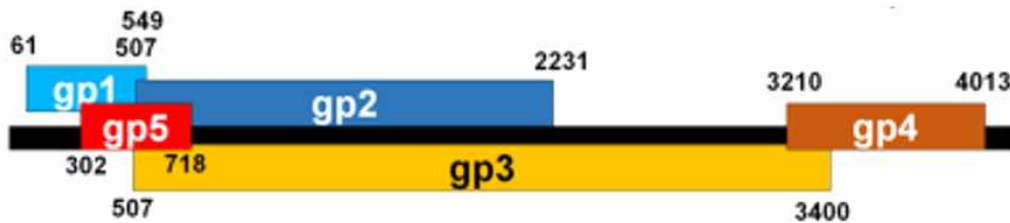
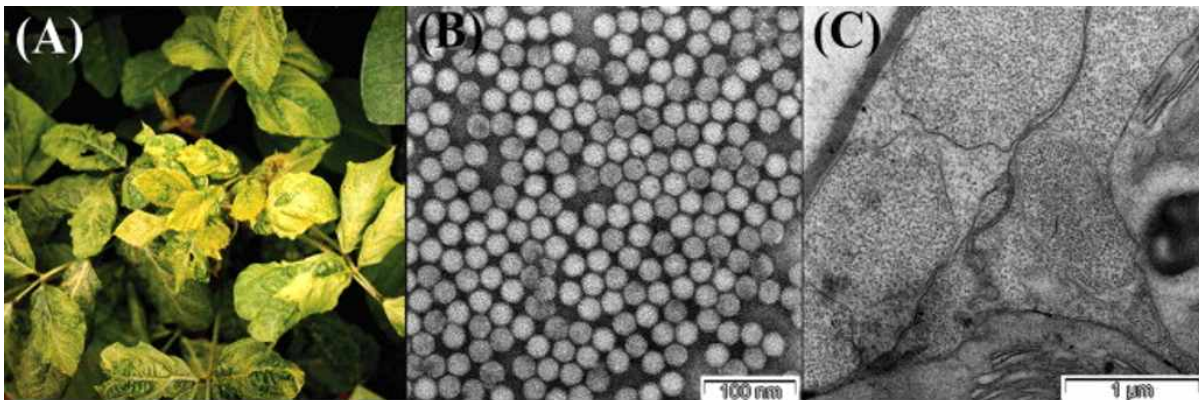
<그림 1-106> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of SMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT SMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 5분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-104).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^8 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 15분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^7 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-105).
- 그림 1-106와 같이 종간 특이도를 분석한 결과, nfo primer probe는 SMV 바이러스만을 잘 검출하였다 (그림 1-106).
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

6. Soybean yellow common mosaic virus (SYCMV) - RPA probe 진단제 개발

■ 주관연구기관- (주) 엘씨엠씨아인스 연구결과

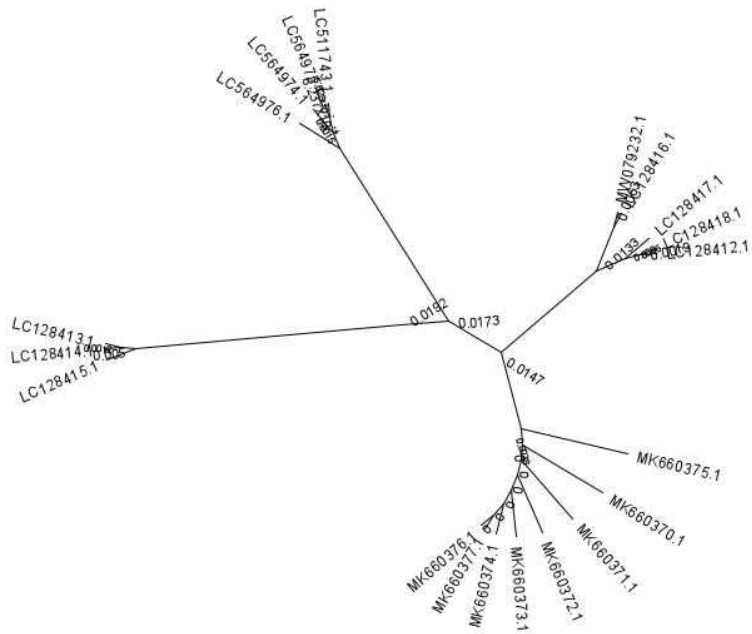
- Sobemovirus 속에 분류되는 positive sense ssRNA 바이러스인 Soybean Yellow Mottle Mosaic virus(SYCMV)가 국내에서 처음 보고되고 특성화되었다. 현재, 유일한 알려진 숙주는 밝은 노란색 모자이크와 잎의 주름을 유발하는 대두입니다. 이 바이러스는 4152개 뉴클레오티드의 단일 양성 가닥 RNA 게놈을 가지고 있습니다. 이 바이러스는 P1(78-566 nt), 다단백질 ORF2a(524-2248 nt), 폴리머라제 도메인 ORF2b(1852-3417 nt) 및 CP(3227-4030 nt)를 인코딩하는 4개의 추정되는 오픈 리딩 프레임에 포함합니다. SYCMV의 전체 염기서열은 이전에 알려진 11종의 소베모바이러스와 31.2-71.3%의 염기 동일성을 보였다. 7과에 속하는 21종과 3개의 서로 다른 *Nicotiana tabacum* 품종에 바이러스를 접종한 SYCMV의 기주 범위 분석에서 SYCMV는 *Glycine max* 및 *G. soja*만 감염시키는 좁은 기주 범위를 보였습니다.



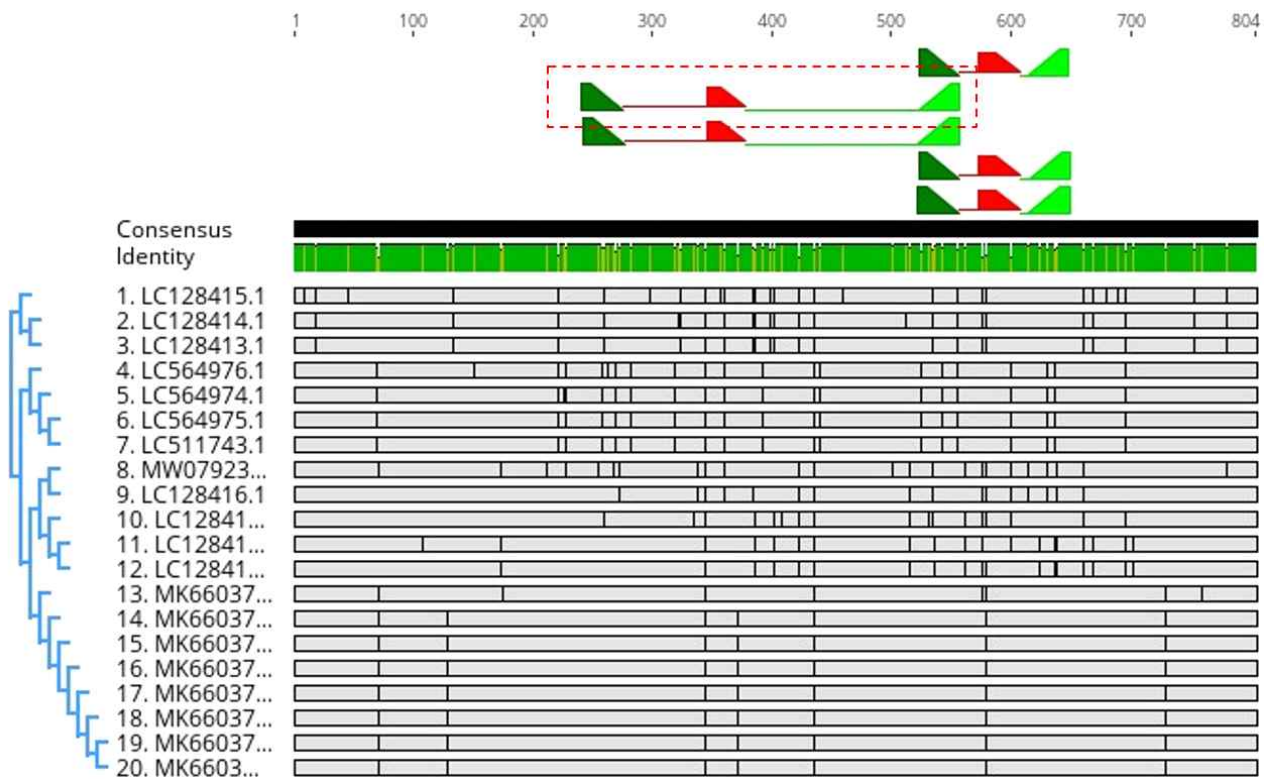
<그림 1-107> Genetic map, symptom, model of SYCMV.

	LC564976.1	LC564975.1	LC511743.1	LC564974.1	LC128415.1	LC128414.1	LC128413.1	MK660377.1	MK660376.1	MK660374.1	MK660373.1	MK660372.1	MK660371.1	MK660370.1	MK660375.1	MW079232.1	LC128416.1	LC128417.1	LC128418.1	LC128412.1	
LC564976.1		99.8%	99.8%	99.6%	95.0%	95.6%	95.9%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	95.8%	96.5%	96.1%	96.1%	96.0%	
LC564975.1	99.8%		100%	99.9%	95.3%	95.9%	96.1%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	96.0%	96.8%	96.4%	96.4%	96.3%	
LC511743.1	99.8%	100%		99.9%	95.3%	95.9%	96.1%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	96.0%	96.8%	96.4%	96.4%	96.3%		
LC564974.1	99.6%	99.9%	99.9%		95.1%	95.8%	96.0%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	96.9%	95.9%	96.6%	96.3%	96.3%	96.1%	96.1%	
LC128415.1	95.0%	95.3%	95.3%	95.1%		98.9%	99.1%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.9%	95.4%	96.4%	96.9%	96.1%	96.5%		
LC128414.1	95.6%	95.9%	95.9%	95.8%	98.9%		99.8%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.5%	96.0%	97.0%	97.5%	96.8%	97.1%	
LC128413.1	95.9%	96.1%	96.1%	96.0%	99.1%	99.8%		96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.3%	97.3%	97.8%	97.0%	97.4%	
MK660377.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660376.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%		100%	100%	100%	100%	100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660374.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%	100%		100%	100%	100%	100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660373.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%	100%	100%		100%	100%	100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660372.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%	100%	100%	100%		100%	100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660371.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%	100%	100%	100%	100%		100%	99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660370.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		99.3%	96.8%	97.5%	97.3%	97.0%	97.1%	
MK660375.1	96.8%	97.0%	97.0%	96.9%	95.9%	96.5%	96.8%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%	99.3%		97.0%	97.8%	97.5%	97.3%	97.4%	
MW079232.1	95.8%	96.0%	96.0%	95.9%	95.4%	96.0%	96.3%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	96.8%	97.0%		98.8%	97.3%	97.0%	97.1%
LC128416.1	96.5%	96.8%	96.8%	96.6%	96.4%	97.0%	97.3%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.5%	97.0%		98.8%		98.0%	97.6%	
LC128417.1	96.1%	96.4%	96.4%	96.3%	96.9%	97.5%	97.8%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.3%	97.5%	97.3%		98.0%		98.3%	
LC128418.1	96.1%	96.4%	96.4%	96.3%	96.1%	96.8%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%	97.0%		98.3%		
LC128412.1	96.0%	96.3%	96.3%	96.1%	96.5%	97.1%	97.4%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.1%	97.4%	97.1%	97.6%	99.6%

<그림 1-108> Homology distance of SYCMV isolates.



<그림 1-109> Phylogenetic tree of SYCMV genes.



<그림 1-110> Candidate primer and probe sets of SYCMV.

1. SYCMV-241F:

5'-CTTTXXXAGAGCTCTCAGTXXXXGTACGATTGT- 3'

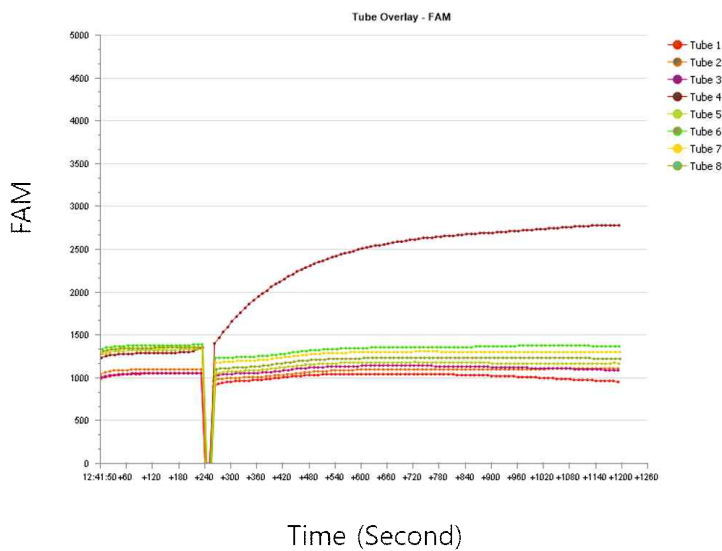
2. SYCMV-346P:

5'- TGG XXX AAG TAC XXX TGG CTC TCA XXX AGG [FAM-dT] A [THF] AC
[BHQ1-dT] TAC CTC XXX GCC XXX-3' Spacer C

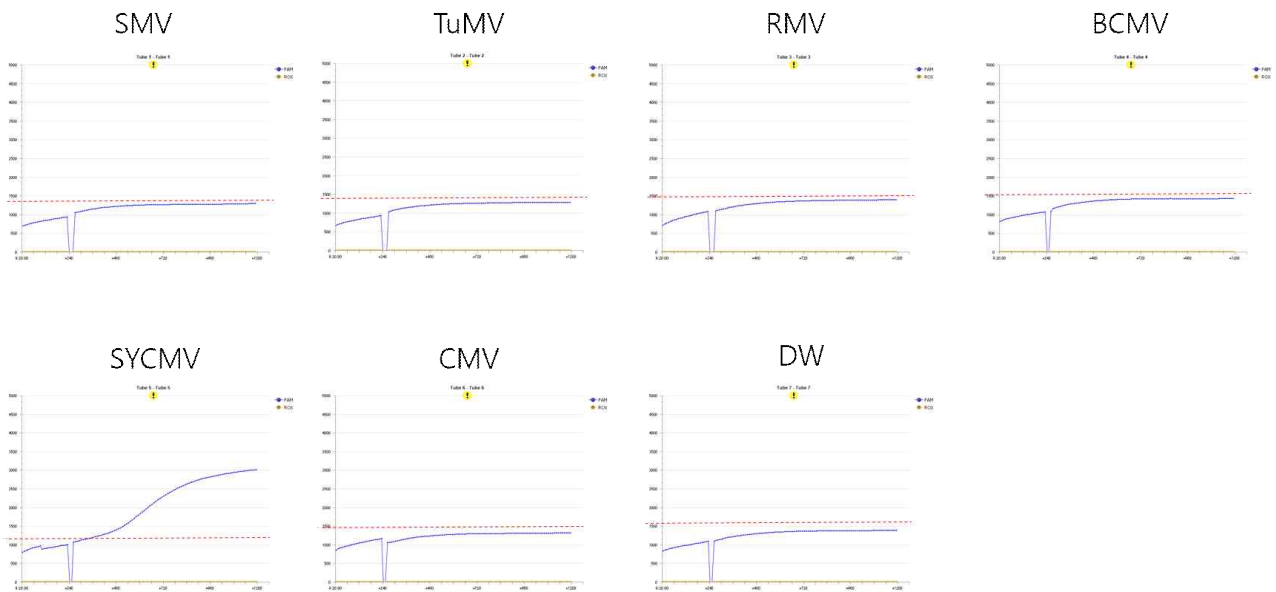
3. SYCMV-557R:

5'-GTATXXXXCACTTAGTTCCXXXXTGAAACATAA-3'

<그림 1-111> RPA exo primer & probe set of SYCMV isolates.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
BCMV4-675 F	0.7 ul
BCMV4-822 R	0.7 ul
BCMV4-714P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.0 ul
Total	20 ul



<그림 1-112> Reaction composition of RPA and specificity of SYCMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, DW; Distilled water.

reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMV-241 F	0.7 ul
SYCMV-557 R	0.7 ul
SYCMV-346 P 1pM	1.0 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	0.5 ul
Total	20 ul

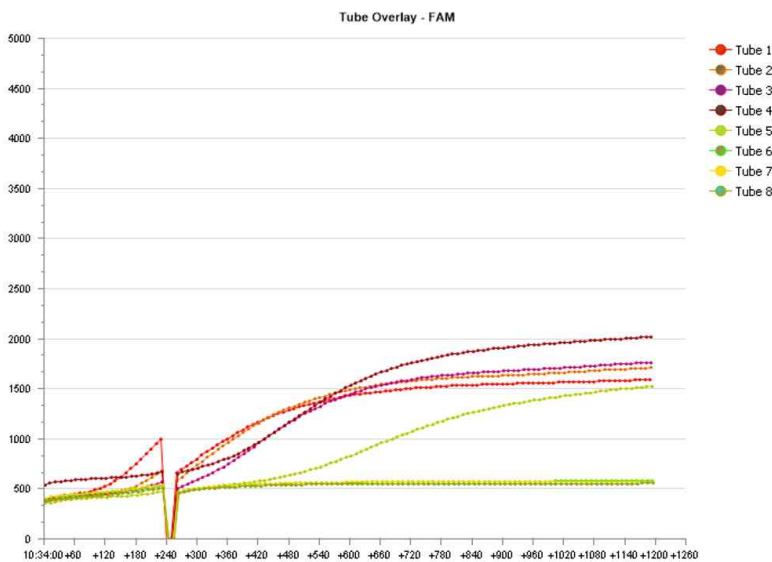
No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	SYCMV DNA	Positive



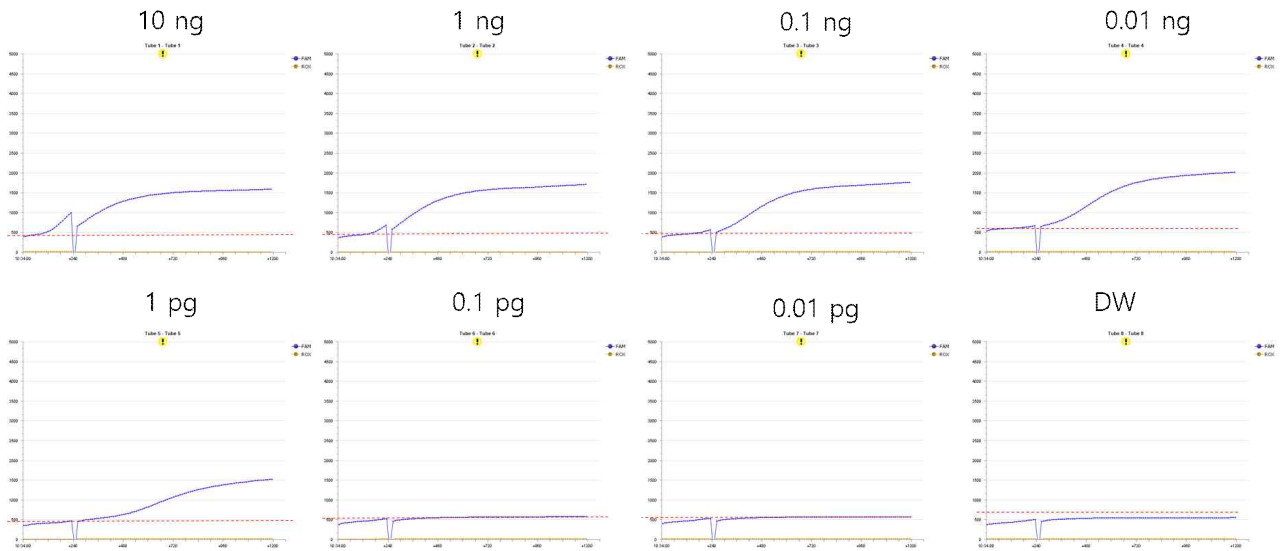
<그림 1-113> RPA Exo-RT reaction of primer probe set of SYCMV with several bacteria.

TGAGCTTTXXXXXXAGCTCTCAGTTACGAGTACGATTGTTGTT
 GCTTCCGAGCTAGTXXXXXXCTACTCAGTGGGCACTTGGCTG
 AGAGGTGTGGCTTCCAACCTGXXXXXXAGTACGCTTGGCTCT
 CAGTGAGGTATACTTACCTCCCCGCCTGXXXXXXCCGACACGG
 CAGGTAXXTTCATATGGGTTTCCAATATGATATGGCAGATAC
 TGTGCCCGTAXXXXXXTAACCAGCTTTCCAATCTGCGTGGCTA
 CGTGTCTGGGCAGGTCTGGTCCGGTTCGTCCGGCTTATGTTT
 CATCAATGGAAC TAAGXXXXXXGATACTTCCTC

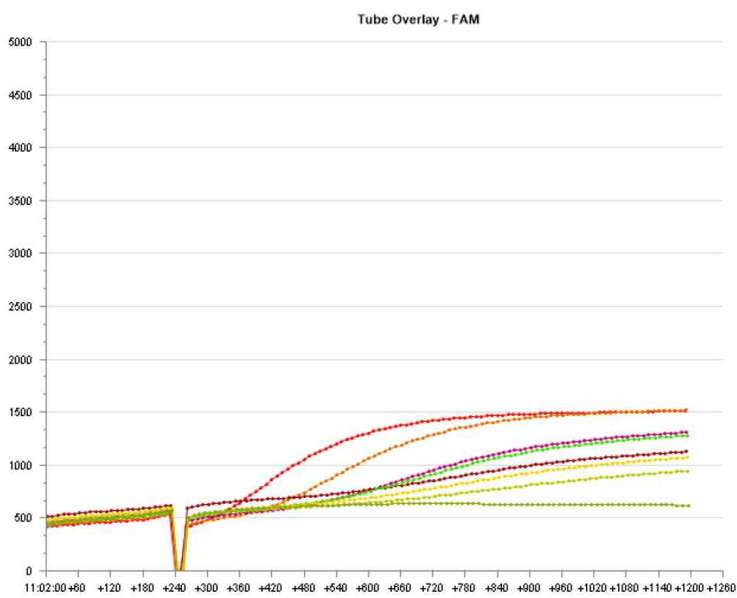
<그림 1-114> Synthetic target gene of SYCMV primer set.



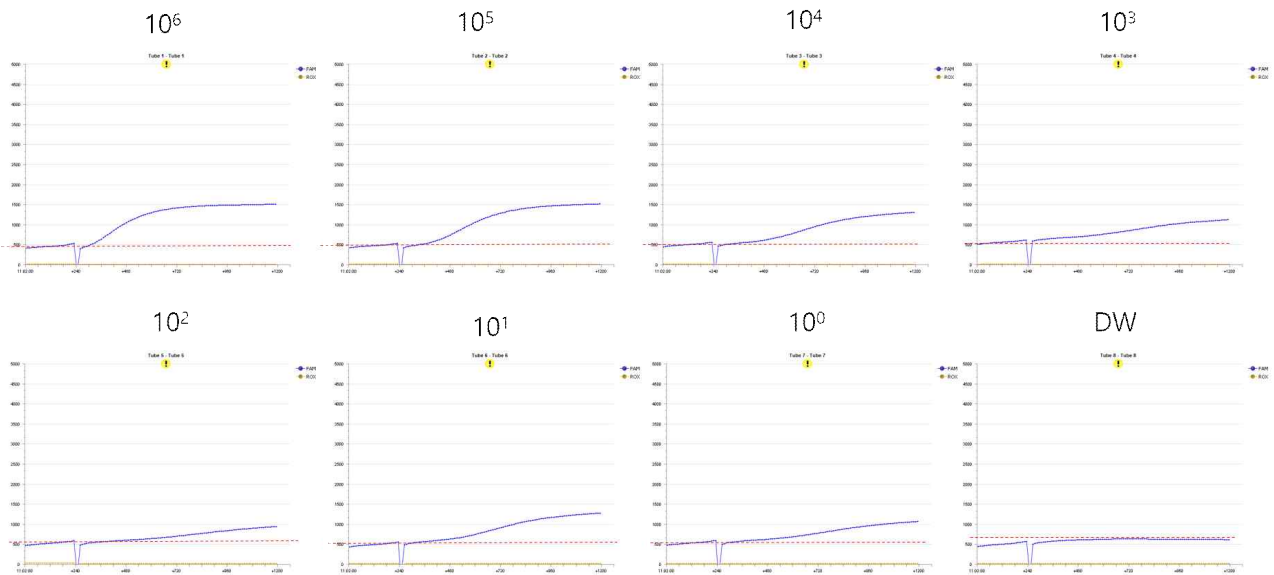
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMV-241 F	0.7 ul
SYCMV-557 R	0.7 ul
SYCMV-346 P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-115> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SYCMV (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMV-241 F	0.7 ul
SYCMV-557 R	0.7 ul
SYCMV-346 P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-116> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SYCMV (copies/ul).

- SYCMV 유전자 20건에 대한 유전자를 분석한 결과 4개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-108, 109).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, SYCMV gene의 중간부분에서 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; SYCMV-241F, SYCMV-346P, SYCMV-557R)의 특성을 평가하였다 (그림 1-110, 111).
- RPA Exo kit를 사용하여 6가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, SYCMV에만 잘 반응하였다 (그림 1-112).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-113).
- SYCMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-114).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-115).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-116).
- 이상의 결과로 RT-RPA SYCMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-117).

-
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-118).
 - SYCMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠사이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-119).



<그림 1-117> SYCMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-SYCMV-ER-50

Soybean Yellow Common Mosaic virus (SYCMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-SYCMV-ER-0001
Issue Date: Jul 25, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
Tel: +82-02-1588-3546 www.ynglobal.wavework.kr, nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggido South Korea.
Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Soybean Yellow Common Mosaic virus (SYCMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of SYCMV gene to detect the SYCMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Soybean yellow common mosaic virus (SYCMV), a positive sense ssRNA virus classified in the genus Sobemovirus, was first reported and characterized in Korea. Currently, its only known host is soybean on which it causes bright yellow mosaic and crinkling of the leaves. The virus has a single, positive-strand RNA genome of 4152 nucleotides. The virus contains four putative open reading frames encoding P1 (78–566 nt), polyprotein ORF2a (524–2248 nt), polymerase domain ORF2b (1852–3417 nt), and CP (3227–4030 nt). The entire nucleotide sequence of SYCMV showed 31.2–71.3% nucleotide identity with the previously known eleven species of sobemovirus. In host range analysis of SYCMV, in which twenty one species and three different *Nicotiana tabacum* cultivars belonging to seven families were inoculated with the virus, SYCMV had a narrow host range, infecting only *Glycine max* and *G. soja*.

The Soybean Yellow Common Mosaic virus (SYCMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Soybean Yellow Common Mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the SYCMV gene for the unique amplification of Soybean Yellow Common Mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	SYCMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	SYCMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	SYCMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	SYCMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

• Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	SYCMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	SYCMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	SYCMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

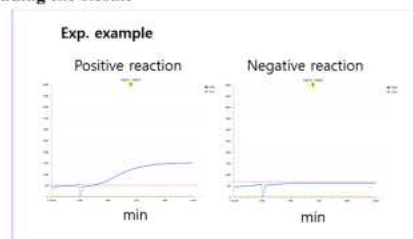
- 1) Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- 2) Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- 3) Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- 4) Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
* It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- 5) Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- 6) Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- 7) Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
* Unknown: clinical sample
* Negative control
* Positive control

8. Reading the Result



<Example of SYCMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	SYCMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	SYCMV Positive
2	+	-	-	SYCMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- 1) For research use only.
- 2) Carefully read this instruction before starting the procedure.
- 3) Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- 4) Do not use the kit after its expiration date written on box.
- 5) Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- 6) Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- 7) Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- 8) Use always sterile pipette tips with filters.
- 9) Wear separate coats and gloves in each area.
- 10) Collected test samples in sterile tubes.
- 11) Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER GO FURTHER

<그림 1-118> Insert of SYCMV ER Detection kit.



LCM SCIENCE

사용 목적

Soybean Yellow Common Mosaic virus (SYCMV) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd.에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 SYCMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE

제품 스펙

검체	SYMMV 감염 의심 작물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20℃

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-SYMMV-ER-50	Soybean Yellow Mottle Mosaic virus (SYMMV) ER-Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

LCM SCIENCE

제품설명서

LCM Science Co., Ltd

1. 목적
2. 사용 목적
3. 제품 특징
4. 사용 방법
5. 보관 방법
6. 주의 사항

LCM SCIENCE

<그림 1-119> Contents of SYCMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ SYCMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. SYCMVnfo-241 F:

5'-CTTTXXXCAGAGCTXXXXXTACGAGXXXGATTGT- 3'

2. SYCMVnfo-346P:

5'- [FAM] TGG XXX XXX TAC GCT TGG XXX TCA GTG AGG TA [THF] AC
T TAC CTC CCC GCC XXX-3' Spacer C

3. SYCMVnfo-557R:

5'- [Biotin] GTAXXAGACACTTAGTTXXXTTGATGAAACAXXA-3'

<그림 1-120> RT-RPA nfo primer probe set of SYCMV.



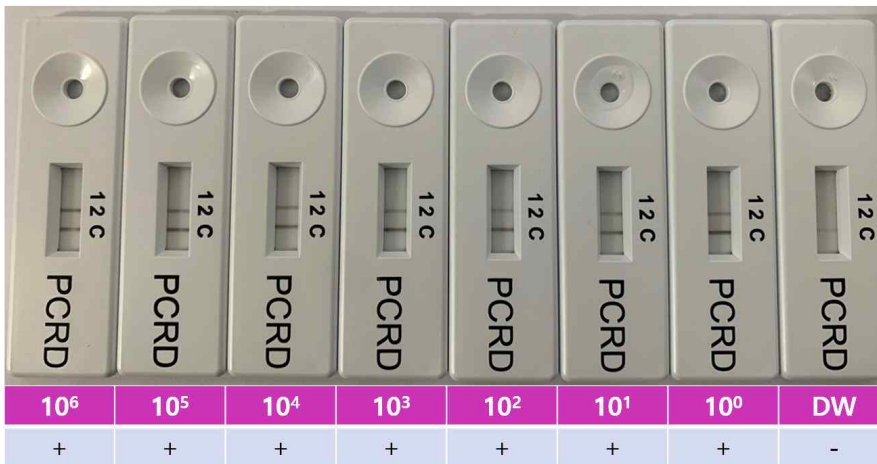
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMVnfo-241F	0.7 ul
SYCMVnfo-557R	0.7 ul
SYCMVnfo-346 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-121> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of SYCMVnfo primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled Water.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMVnfo-241F	0.7 ul
SYCMVnfo-557R	0.7 ul
SYCMVnfo-346 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-122> Sensitivity of SYCMVnfo primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2.0 ul
20x B	1.0 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYCMVnfo-241F	0.7 ul
SYCMVnfo-557R	0.7 ul
SYCMVnfo-346 P 10 pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

<그림 1-123> Sensitivity of SYCMVnfo primer and probe (copies/ul).

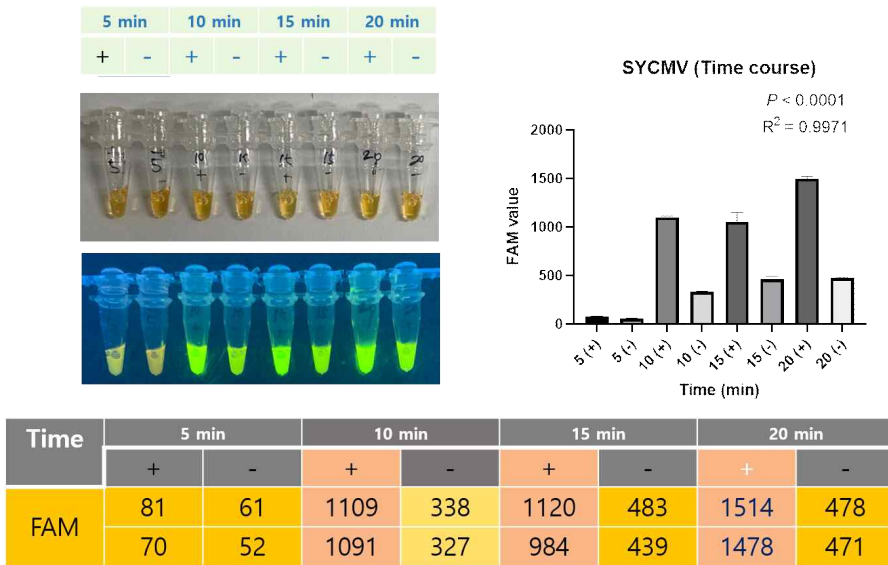
reagent	volume	1	2	3	4	5	6	+	-
2x R Buffer	10 ul								
100 mM dNTP	0.7 ul								
10x B	2.0 ul								
20x B	1.0 ul								
50x B	0.4 ul								
RT	0.4 ul								
SYCMVnfo-241F	0.7 ul								
SYCMVnfo-557R	0.7 ul								
SYCMVnfo-346 P 10 pM	0.3 ul								
MgOAc	1.6 ul								
RNA	1.0 ul								
DW	1.2 ul								
Total	20 ul								

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	SYCMV - mRNA transcript	Positive

<그림 1-124> Specificity of SYCMVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

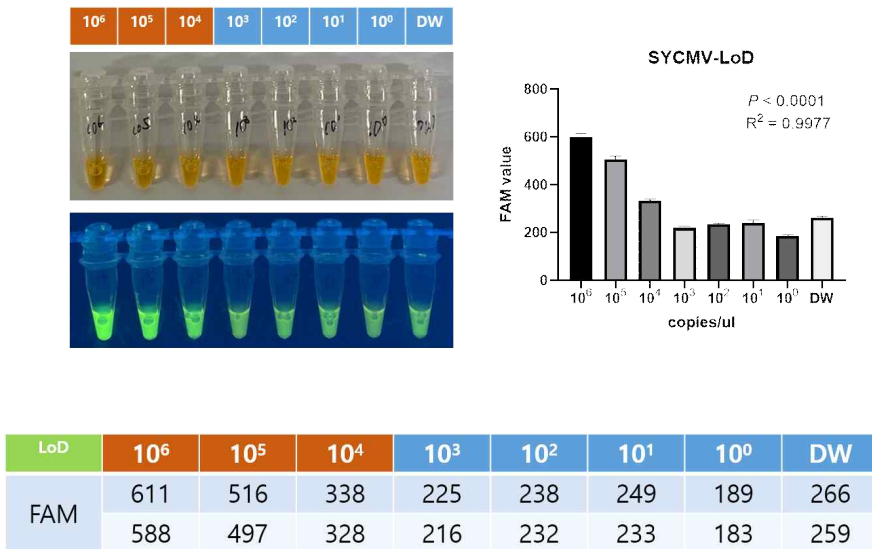
- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT SYCMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-120).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-121과 같이 nfo primer probe는 SYCMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.01 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-122).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 1 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-123).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-124).

■ SYCMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



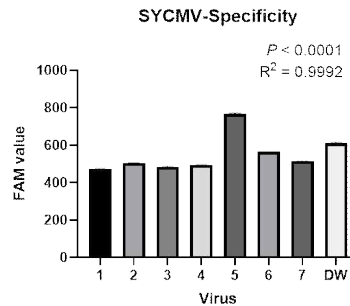
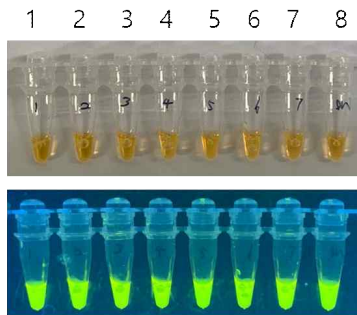
Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SYCMVnfo-241F	0.8 ul
SYCMVnfo-557R	0.8 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.3 ul
Total	20 ul

<그림 1-125> RPA end point reaction with primer set of SYCMV according to the time.



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SYCMVnfo-241F	0.8 ul
SYCMVnfo-557R	0.8 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.3 ul
Total	20 ul

<그림 1-126> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of SYCMV.

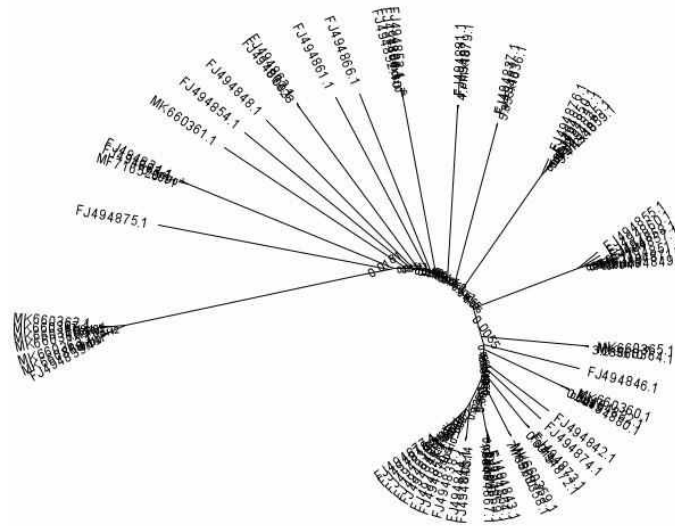


Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SYCMVnfo-241F	0.8 ul
SYCMVnfo-557R	0.8 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.3 ul
Total	20 ul

No	1	2	3	4	5	6	7	8
Virus	SMV SYMMV (7/15/22)	TuMV (6/3/22)	RMV (6/3/22)	BCMV (4/15/22)	SYCMV SYMMV (7/15/22)	CMV (9/13/22)	TYMV (5/25/22)	DW
FAM	476 469	506 501	487 482	497 494	771 765	565 565	516 514	606 614

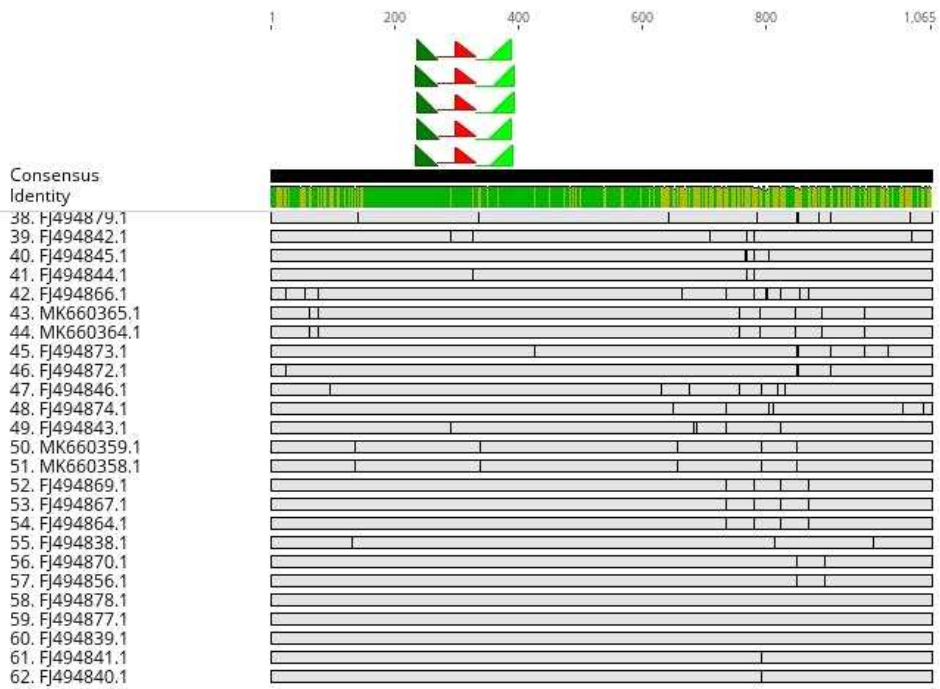
<그림 1-127> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of SYCMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT BCMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-125).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 20분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^4 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-126).
- 그림 1-127와 같이 종간 특이도를 분석한 결과, nfo primer probe는 SYCMV 바이러스만을 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

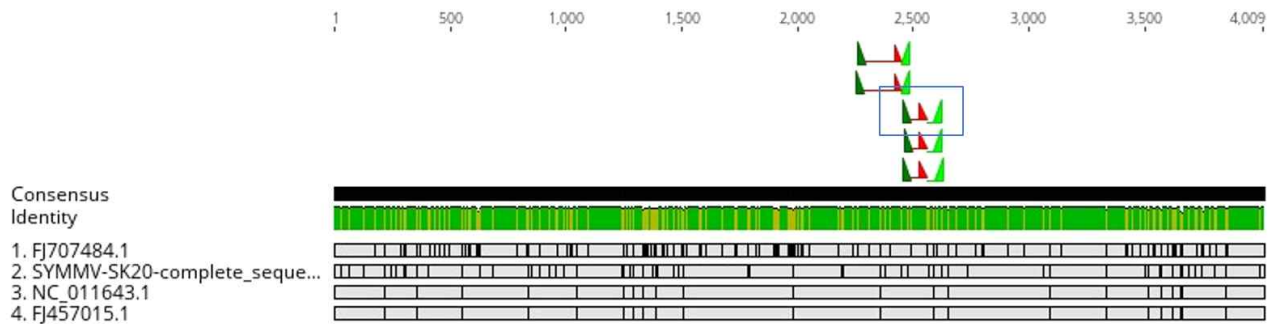


<그림 1-130> Phylogenetic tree of SYMMV genes.

(A)



(B)



<그림 1-131> Candidate primer and probe sets of SYMMV (A) and SYMMV2 (B).

(A)

1. SYMMV-236F:

5'-ATACXXXXXXXXTGGGGAACTCTTXXXXCTAATA - 3'

2. SYMMV-297P:

5'-TGC XXX TAT CGC XXX GAC ACT XXX CCC AAG [FAM-dT] GA [THF] CC
[BHQ1-dT] GCA XXX TTC AAT XXX - C3 Spacer

3. SYMMV-387R:

5'- GATCTXXAATTAATGAGTXXXXCATATCATAC -3'

(B)

1. SYMMV2-2458F:

5'- TCACXXXXXXXXTATTAATTTTAXXXXXGACGCAAT - 3'

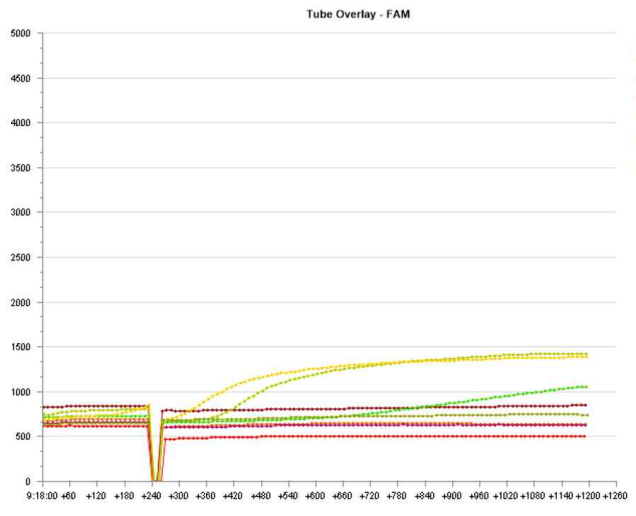
2. SYMMV2-2524P:

5'- ACA TAA XXX CTG CCA XXX TTC TAG XXX TTT [FAM-dT] C [THF] A
[BHQ1-dT] TGC XXX TCC AAC XXX -C3 Spacer

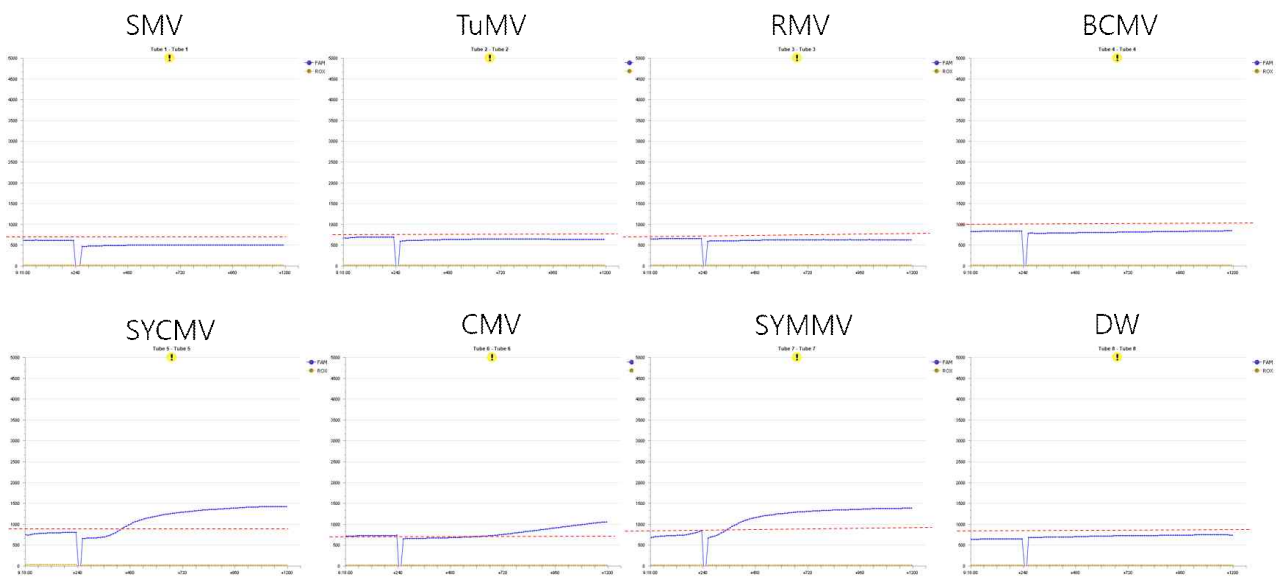
3. SYMMV2-2652R:

5'- TATAXXXXTATCTTAGACGTAXXXXXGTGTGTTA -3'

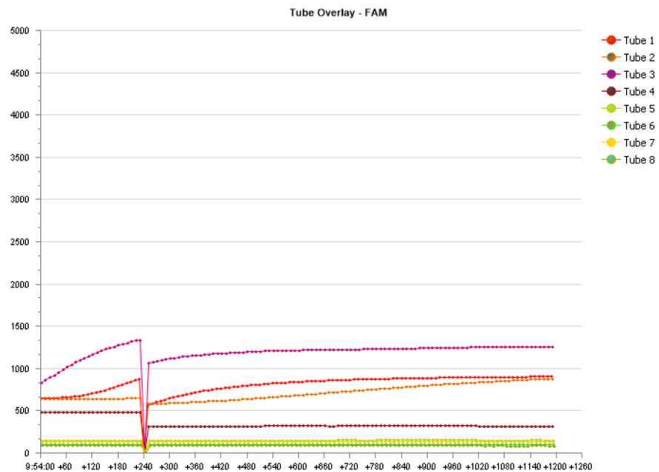
<그림 1-132> RPA exo primer & probe sets of SYMMV isolates.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2-2652 R	0.7 ul
SYMMV2-2524 P 1pM	0.5 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul

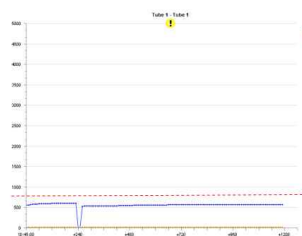


<그림 1-133> Reaction composition of RPA and specificity of SYMMV primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, DW; Distilled water.

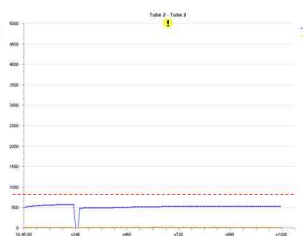


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
Cos-SYMMV2-2458 F	0.7 ul
Cos-SYMMV2-2652 R	0.7 ul
SYMMV2-2524 P 1pM	0.1 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul

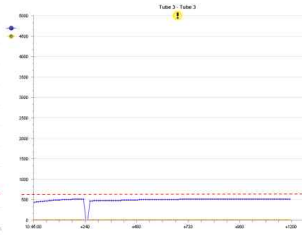
Brevibacterium casei



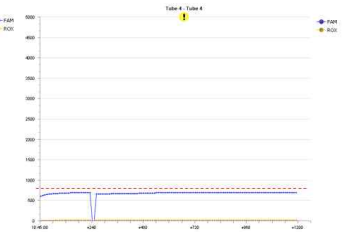
Micrococcus luteus



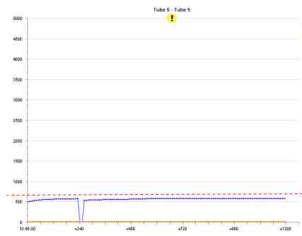
Streptococcus pyogenes



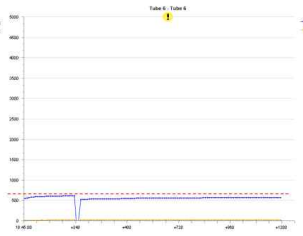
Streptococcus mitis/oralis



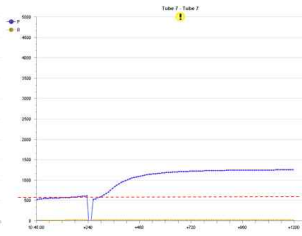
Serratia marcescens



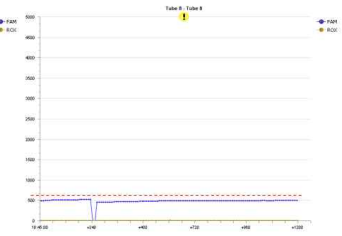
Enterobacter aerogenes



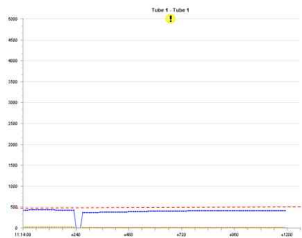
+ control of SYMMV



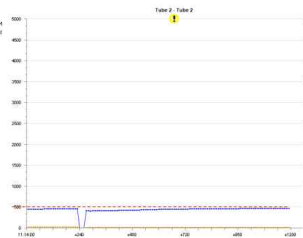
DW



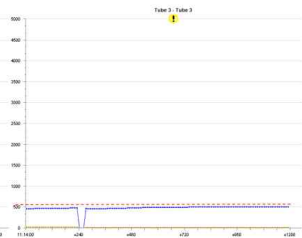
Klebsiella oxytoca



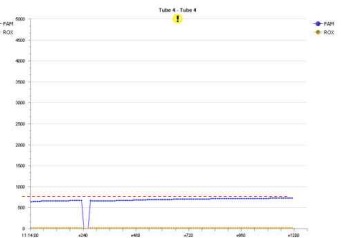
Staphylococcus warneri



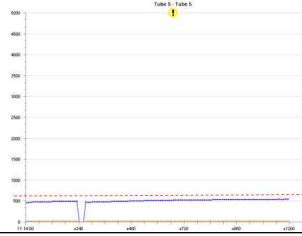
Proteus mirabilis



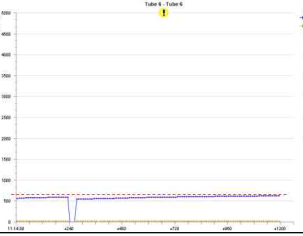
Citrobacter freundii



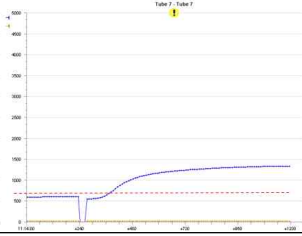
Enterococcus faecalis



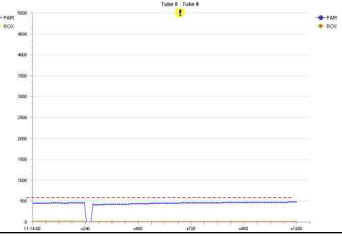
Streptococcus agalactiae



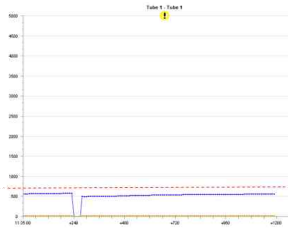
+ control of SYMMV



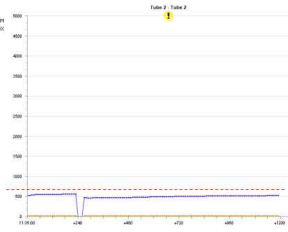
DW



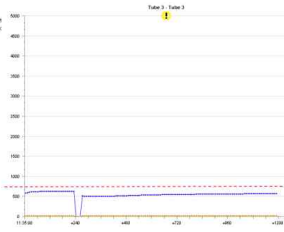
Staphylococcus epidermidis



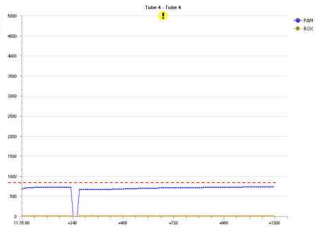
Enterobacter cloacae
ssp. cloacae



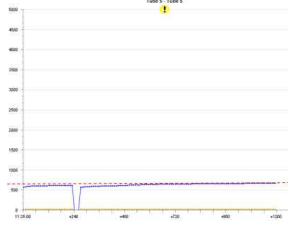
Propionibacterium acnes



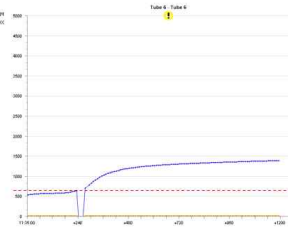
Dermabacter hominis



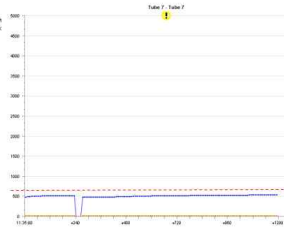
Stenotrophomonas
maltophilia



SYMMV - RNA



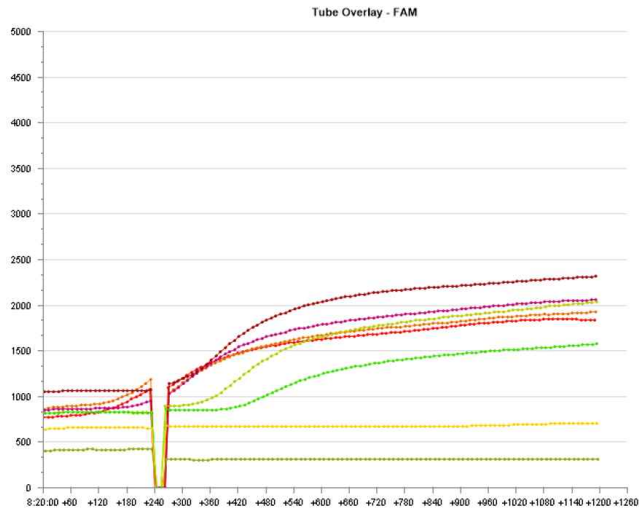
DW



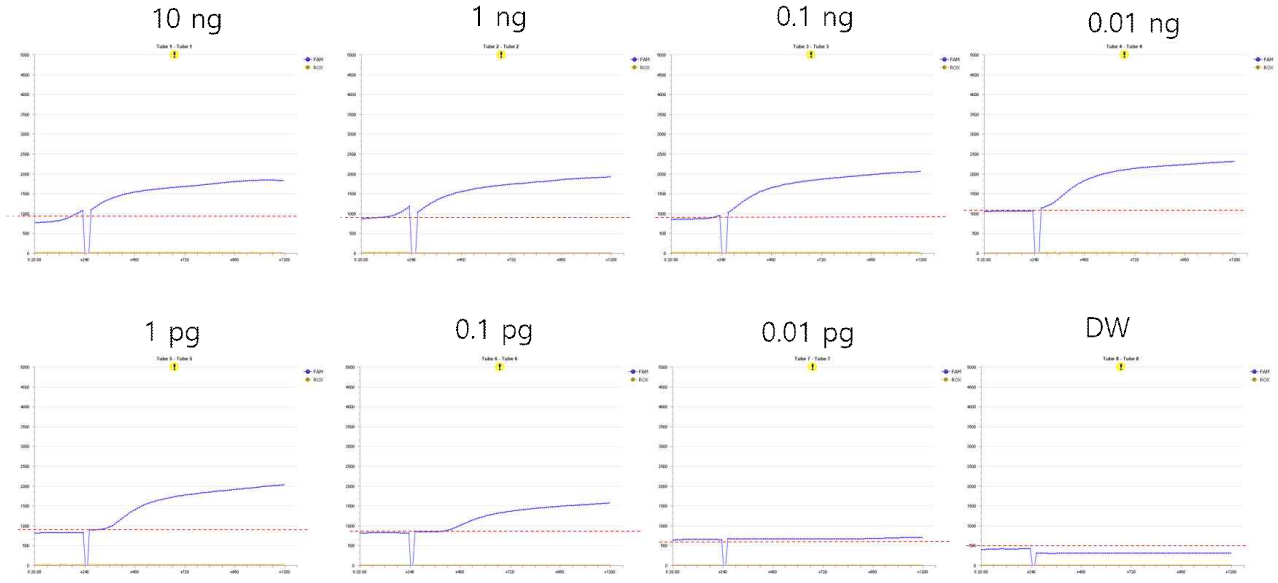
<그림 1-134 RPA Exo-RT reaction of primer probe set of SYMMV with several bacteria.

```
GGTCACAGTCAAXXXXXXXXXTTAATATTTGACGCAATCGCCCCTAGGGTAACAAAC  
ATAACATCTGCCATTCTTCTAGCCATTTTCTATTGCTATTCCAACCTACTGCAAGCAT  
TCCTTACAXXXXXXXXXGCCGTAACACACTCTAGTACGTCTAAGATAGTTTATATAGCCG  
GGTCACAGTCAATATTAATTTTAATATTTGACGTAATCGCCCCTAGGGTAACAAACAT  
AACATCTGCCATTCTTCTAGCCATTTTXXXXXXXXXXTCTACTGCAAGCATTTCCTTAC  
ATTTCTCAGCCTGTAACACACTCTAGCACGTCTAAGATAGTTTATATAGCCG
```

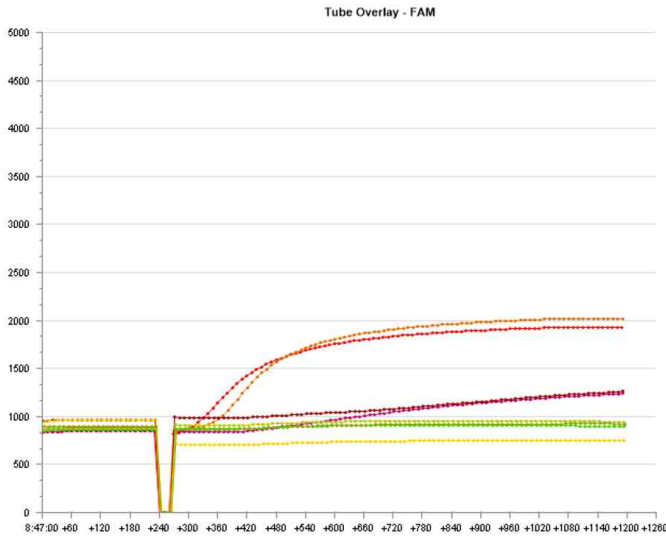
<그림 1-135> Synthetic target gene of SYMMV primer set.



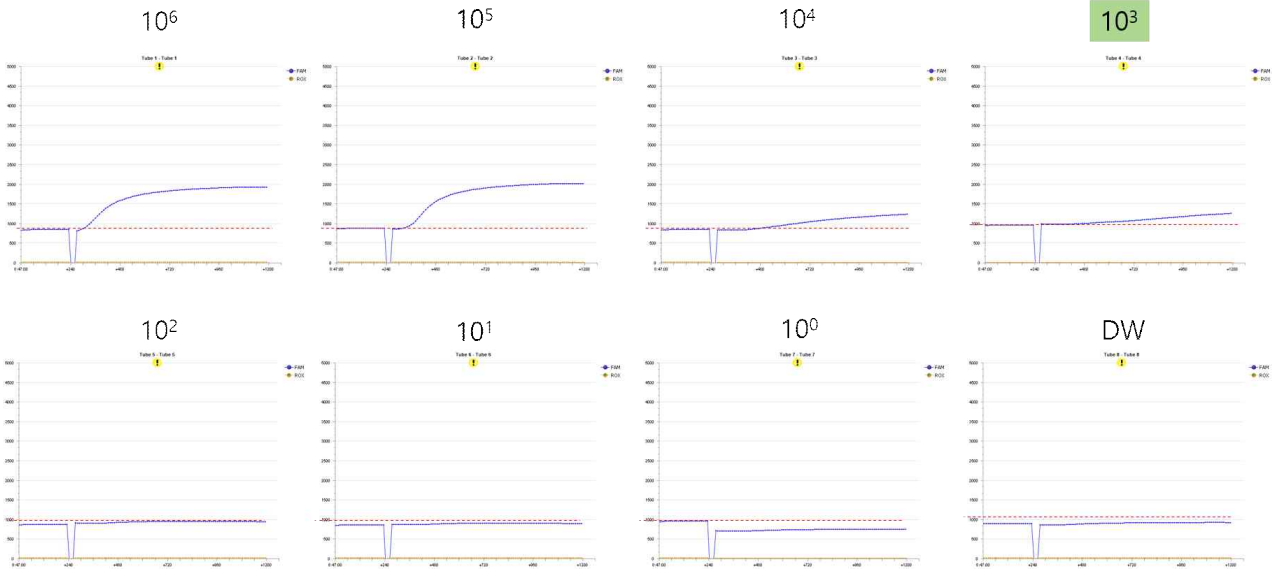
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
Cos-SYMMV2-2458 F	0.7 ul
Cos-SYMMV2-2652 R	0.7 ul
SYMMV2-2524 P 1pM	0.1 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul



<그림 1-136> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SYMMV (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
Cos-SYMMV2-2458 F	0.7 ul
Cos-SYMMV2-2652 R	0.7 ul
SYMMV2-2524 P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul



<그림 1-137> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of SYMMV (copies/ul).

- SYMMV 유전자 62건에 대한 유전자를 분석한 결과 2개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-129, 130).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, SYMMV gene의 5' 쪽에서 여러개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; SYMMV-236F, SYMMV-297P, SYMMV-387R)(그림 1-131A, 132A)의 특성을 평가하였으나, 반응이 안좋아서 다시 새로운 프로브와 프라이머를 재합성하였다 (Primer probe set; SYMMV2-2458F, SYMMV2-2524P, SYMMV2-2652R)(그림 1-131B, 132B).
- RPA Exo kit를 사용하여 7가지의 작물 관련 바이러스들 (SMV; Soybean mosaic virus.

TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus)과 교차반응을 조사한 결과, SYMMV, CMV, SYCMV와 반응하였다 (그림 1-133). CMV와 SYCMV와 반응한 것은 검체에 교차 감염과 시료의 오염때문인 것으로 확인되어 SYMMV2 primer와 probe set의 특이도에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-134).
- SYMMV primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-135).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-136).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 10^3 copies/ul 만 반응을 하였다 (그림 1-137).
- 이상의 결과로 RT-RPA SYMMV detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-138).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-139).
- TYMV ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠씨아이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-140).



<그림 1-138> SYMMV ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-SYMMV-ER-50

Soybean Yellow Mottle Mosaic virus(SYMMV) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-SYMMV-ER-0001
Issue Date: Jul 25, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd

Tel: +82-02-1588-3546 www.vuglobal.wavevwork.kr, nova3546@lcmscience.co.kr

161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwaseong-si Gyeonggido South Korea.

Technical Support by SpegeneBio Co., Ltd

Tel: +82-31-8018-2150 spegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Soybean Yellow Mottle Mosaic virus(SYMMV) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of SYMMV gene to detect the SYMMV viral RNA from specimens.

4. Product Description

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) is one of the most important leguminous crops in the world, but various virus species have been reported to infect it and to cause serious losses in yield and quality. Soybean yellow mottle mosaic virus (SYMMV) is a new member of the genus *Gammacarmovirus* (family *Tombusviridae*). It was first reported to be infecting soybean in North America and South Korea, where it caused mottling, mosaic, and crinkling symptoms and severely inhibited plant growth. Among legume plants tested, more than a third of *G. soja* (wild soybean) contained SYMMV, indicating that the wild soybean played an important role as a reservoir of SYMMV. Wild soybeans may be infected with SYMMV as early as mid-July. Considering the results of early infection and the high infection rate of seed and seed transmission of SYMMV in *G. soja*, wild soybeans may have played an important role in the completion of disease cycle of the virus.

The Soybean Yellow Mottle Mosaic virus(SYMMV) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Soybean Yellow Mottle Mosaic virus by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the SYMMV gene for the unique amplification of Soybean Yellow Mottle Mosaic virus RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	SYMMV Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	SYMMV Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	SYMMV Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	SYMMV Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/
Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	SYMMV Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	SYMMV Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	SYMMV Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

* Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.

* Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

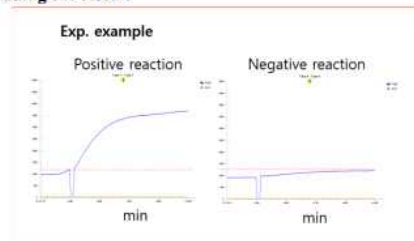
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
 - Unknown: clinical sample
 - Negative control
 - Positive control

8. Reading the Result



<Example of SYMMV RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	SYMMV RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	SYMMV Positive
2	+	-	-	SYMMV Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
GO FARTHER, GO FURTHER



사용 목적

Soybean Yellow Mottle Mosaic virus (SYMMV) ER-Detection Kit는 TwiStDx Ltd. 에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터링을 통해 실시간으로 SYMMV를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자를 위한 동영상 제공 (준비중)

제품 스펙

검체	SYMMV 감염의심 식물
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)
특이도	100%
보관온도	-20°C

주문 정보

Cat. No.	재용량	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-SYMMV-ER-50	Soybean Yellow Mottle Mosaic virus (SYMMV) ER-Detection Kit	-20°C	50T/Kit	₩500,000 (VAT 별도)

제품설명서

<그림 1-140> Contents of SMV ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ SYMMV nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. SYMMV2-2458F:

5'- TCACXXXXXATATTAATTTTAATATTXXXXXCAAT - 3'

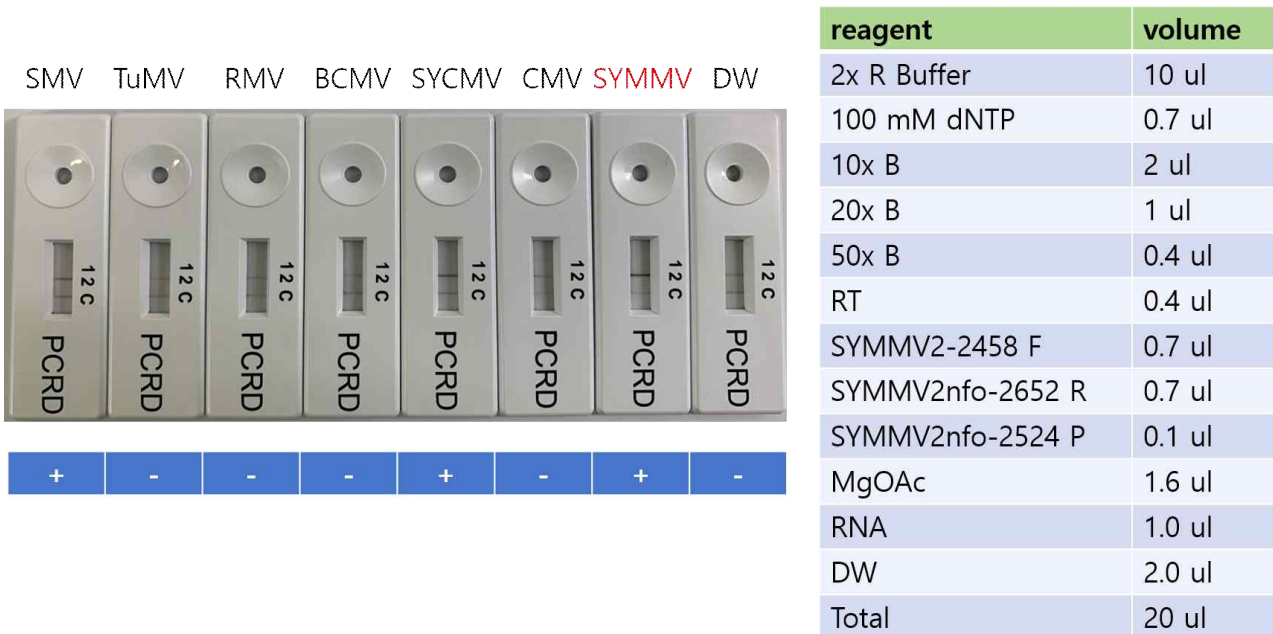
2. SYMMV2nfo-2524P:

5'- [FAM] ACA TAA XXX CTG CCA TTC XXX TAG CCA TTT T C [THF] A
T TGC TAT TCC AAC XXX -C3 Spacer

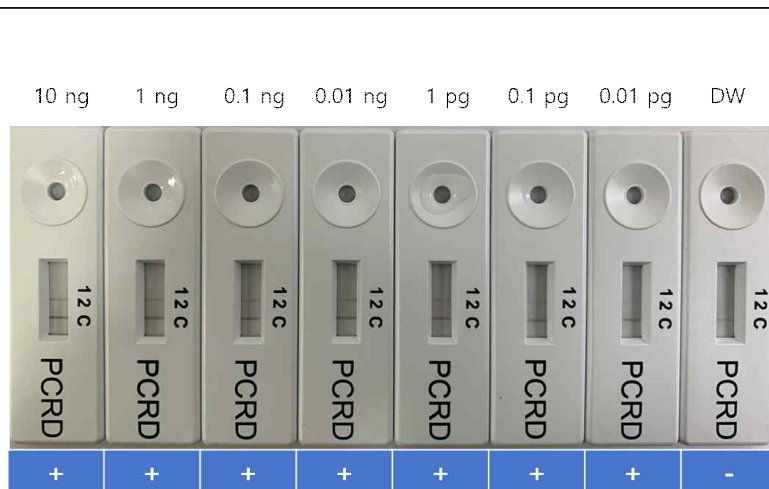
3. SYMMV2nfo-2652R:

5'- [Biotin] TATXXXXXCTATCTTAGACGTACXXXXXTGTGTTA -3'

<그림 1-141> RT-RPA nfo primer probe set of SYMMV.

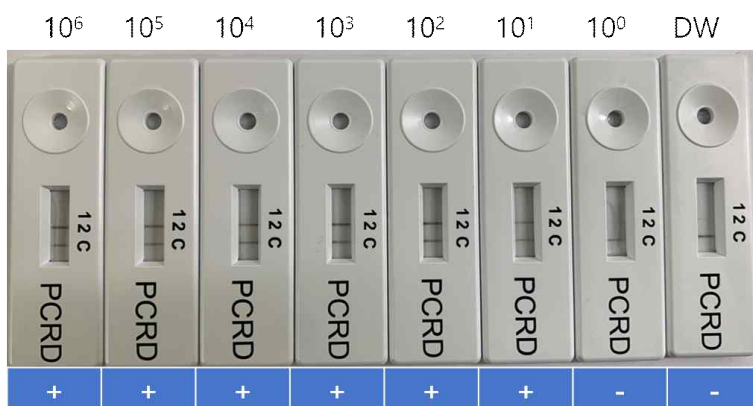


<그림 1-142> Reaction composition of RPA-LFD reaction and specificity of SYMMVnfo primer and probe. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, DW, Distilled water.



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul
SYMMV2nfo-2524 P	0.1 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul

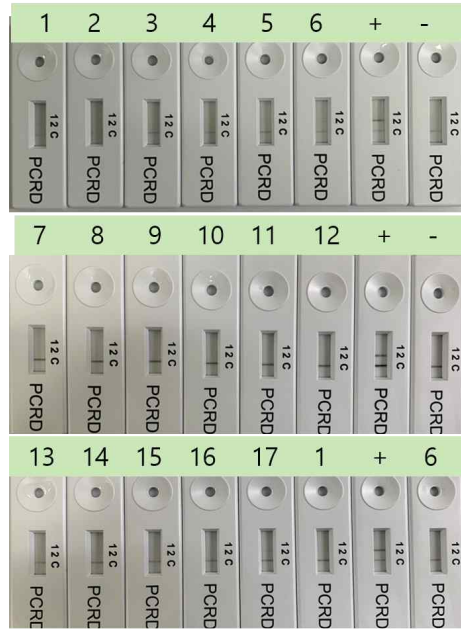
<그림 1-143> Sensitivity of SYMMVnfo primer and probe (concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul
SYMMV2nfo-2524 P	0.1 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul

<그림 1-144> Sensitivity of SYMMVnfo primer and probe (copies/ul).

reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul
SYMMV2nfo-2524 P	0.1 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.0 ul
Total	20 ul

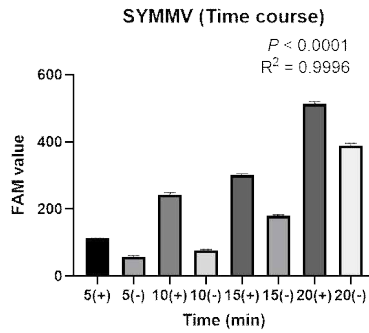
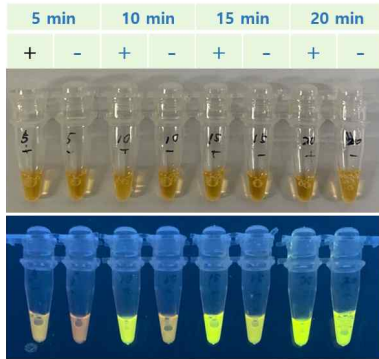


No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	SYMMV - mRNA transcript	Positive

<그림 1-145> Specificity of SYMMVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT SYMMV primer & probe set를 응용하여 PCRD nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-141).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39°C에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCRD 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 그림 1-142과 같이 nfo primer probe는 SYMMV 바이러스 외에도 SYCMV, SMV도 반응하였으나 이들은 혼합감염으로 확인되었다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.1 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-143).
- 목표유전자를 10⁶ 부터 10⁰ 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 10 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-144).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-145).

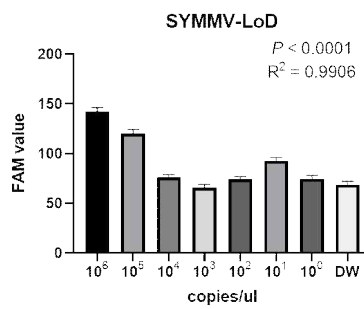
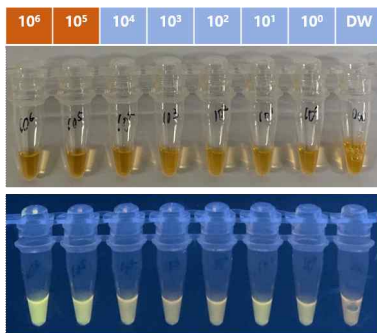
■ SYMMV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	113	60	247	79	304	182	518	394
	112	56	238	75	299	177	510	385

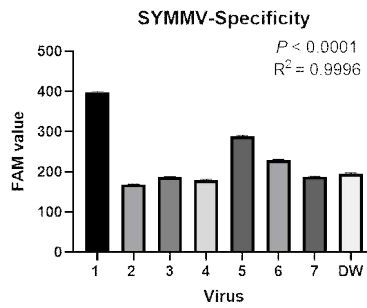
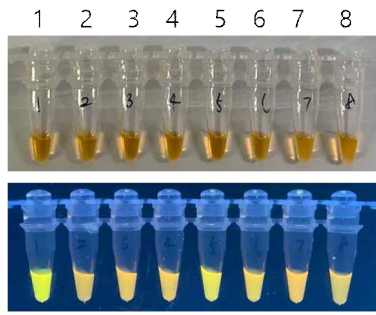
<그림 1-146> RPA end point reaction with primer set of SYMMV according to the time.



Reagent	Volume	10x
2x RB	10 ul	100
100mM dNTP	0.6 ul	6
10x E. Mix	2.0 ul	20
20x core Mix	1.0 ul	10
SYMMV2-2458 F	0.7 ul	7
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul	7
RT	0.5 ul	5
MgOAC	1.0 ul	10
RNA	1.0 ul	
DW	2.5 ul	25
Total	20 ul	

LoD	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	DW
FAM	145	123	78	68	76	95	77	71
	139	117	74	63	72	90	72	66

<그림 1-147> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of SYMMV.

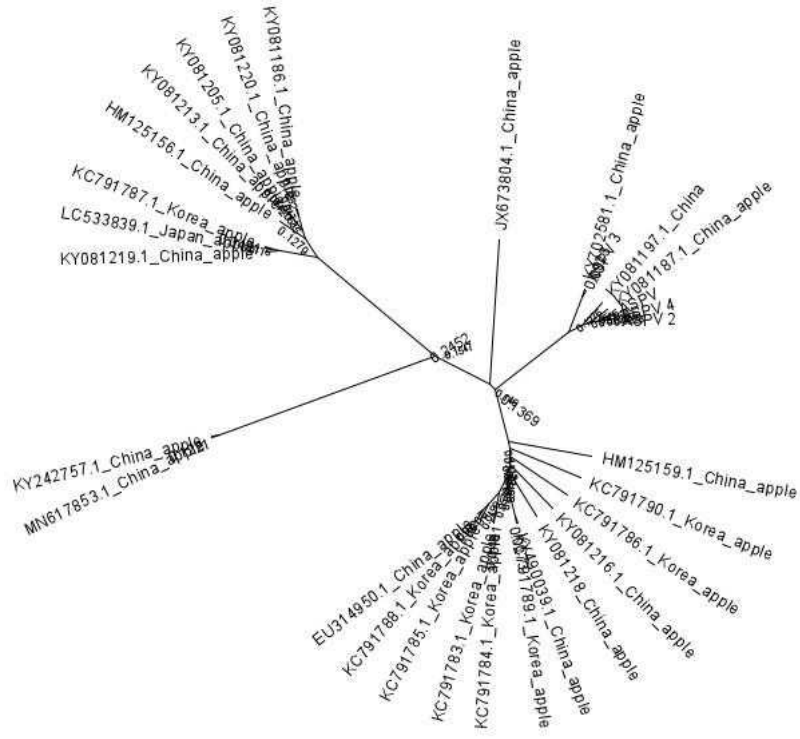


Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
SYMMV2-2458 F	0.7 ul
SYMMV2nfo-2652 R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

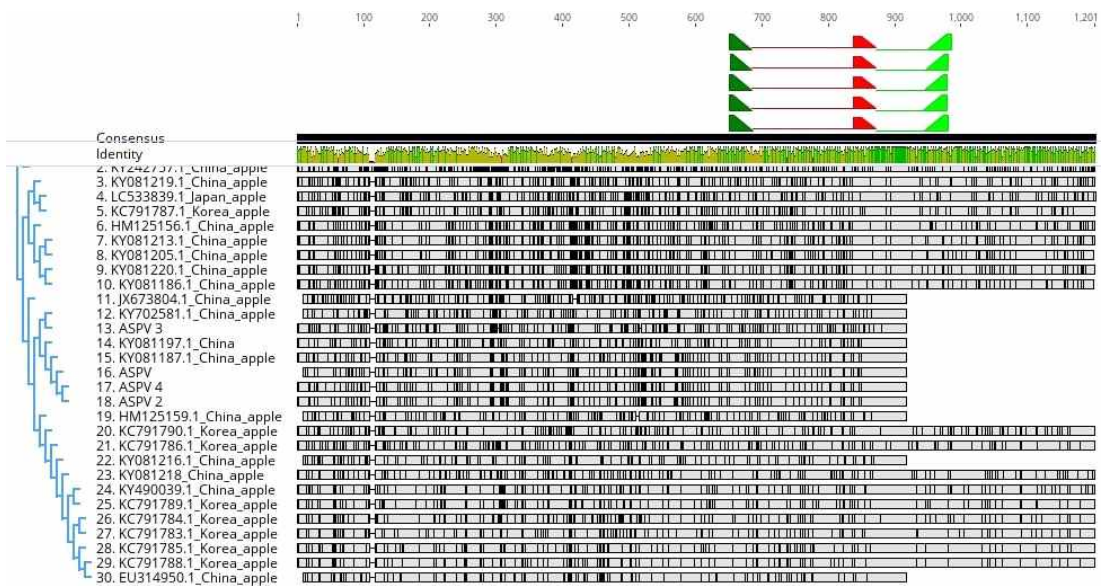
No	1	2	3	4	5	6	7	8
Virus	SMV SYMMV (7/15/22)	TuMV (6/3/22)	RMV (6/3/22)	BCMV (4/15/22)	SYCMV SYMMV (7/15/22)	CMV (9/13/22)	TYMV (5/25/22)	DW
FAM	396	168	186	178	286	228	187	194
	400	170	188	181	290	231	189	197

<그림 1-148> Reaction composition of RPA end point reaction and specificity of SYMMV primer. SMV; Soybean mosaic virus, TuMV; Turnip mosaic virus, RMV; Ribgrass mosaic virus, BCMV; Bean common mosaic virus, SYCMV; Soybean yellow common mosaic virus, CMV; Cucumber mosaic virus, SYMMV; Soybean yellow mottle mosaic virus, TYMV; Turnip yellow mosaic virus, DW; Distilled water (negative control).

- 엘씨엠사이언스에서 개발한 Exo RT TYMV primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39℃에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 5분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-146).
- 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39℃에서 15분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^5 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-147).
- 그림 1-148와 같이 종간 특이도를 분석한 결과, nfo primer probe는 SYMMV 바이러스만을 잘 검출하였고 혼합감염된 샘플도 잘 검출하였다.
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다 (그림 1-148).



<그림 1-151> Phylogenetic tree of ASPV genes.



<그림 1-152> Candidate primer and probe set of ASPV (No.1).

1. ASPV- 652F:

5'-GTTGTTGCAAGCAATCAAAAGATAAGAGCTGTT- 3'

2. ASPV- 838P:

5'- GTT GGA ACA ATG ATC AAG CAA ACT GAG GGG [FAM-dT] G [THF] AC
[BHQ1-dT] TTG AGG CAG TAT TGT - C3 Spacer

3. ASPV- 985R:

5'- AAGCAGCATACCTAGTTTCAAATTTAAATTCTTTA -3'

<그림 1-153> RPA exo primer & probe set of ASPV isolates (No.1).

1. ASPV2- 642F:

5'- CGTTGTGGCAAGCAATCAAAAGATAAGAGCTGTTG - 3'

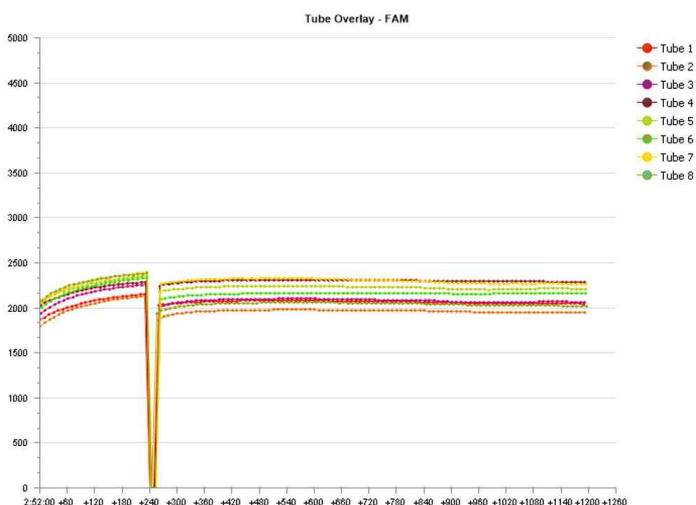
2. ASPV2- 865P:

5'- GAG GCA GTA TTG TGC CTT TTA CGC AAA GCA [FAM-dT] G [THF] C
[BHQ1-dT] GGA ACC TCA TGC TGC - C3 Spacer

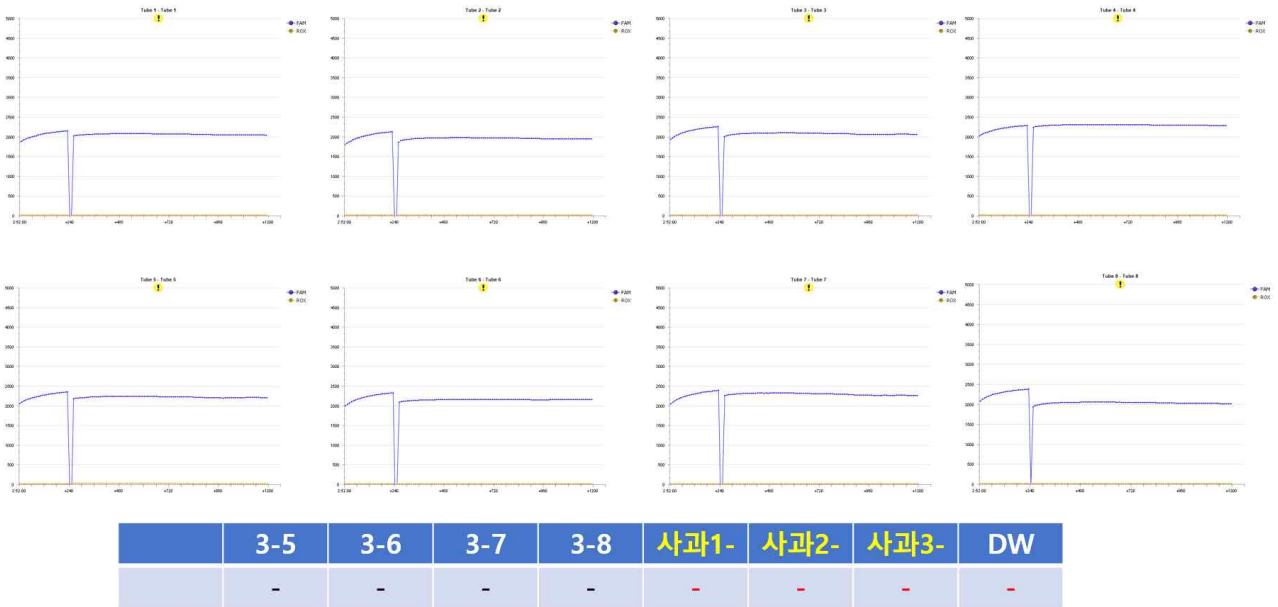
3. ASPV2- 973R:

5'- CCGCATACCTAGTTTCAAATTTAAATTCTTTACC -3'

<그림 1-154> RPA exo primer & probe set of ASPV isolates (No.2).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
ASPV2- 642F	0.7 ul
ASPV2- 973R	0.7 ul
ASPV2- 865P 1pM	0.2 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.3 ul
Total	20 ul



<그림 1-155> RPA exo reaction of primer & probe set of ASPV2 (No.2).

1. ASPV3- 135F:

5'- AGTGATTTCTCAAGTTCAATCCTTAGCTCCCATTG - 3'

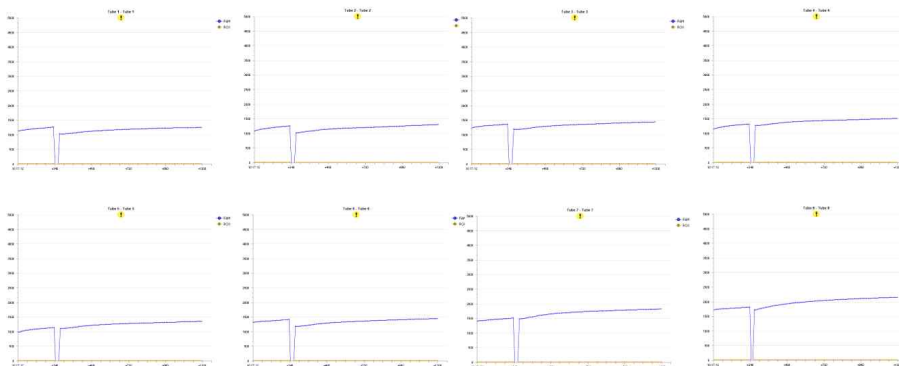
2. ASPV3- 193P:

5'- TTT TGA TCC AAA TCT GCA TGG ACG GTT GAC [FAM-dT] AA [THF] G
[BHQ1-dT] ACA GAT GAG GCA G GC - C3 Spacer

3. ASPV3- 337R:

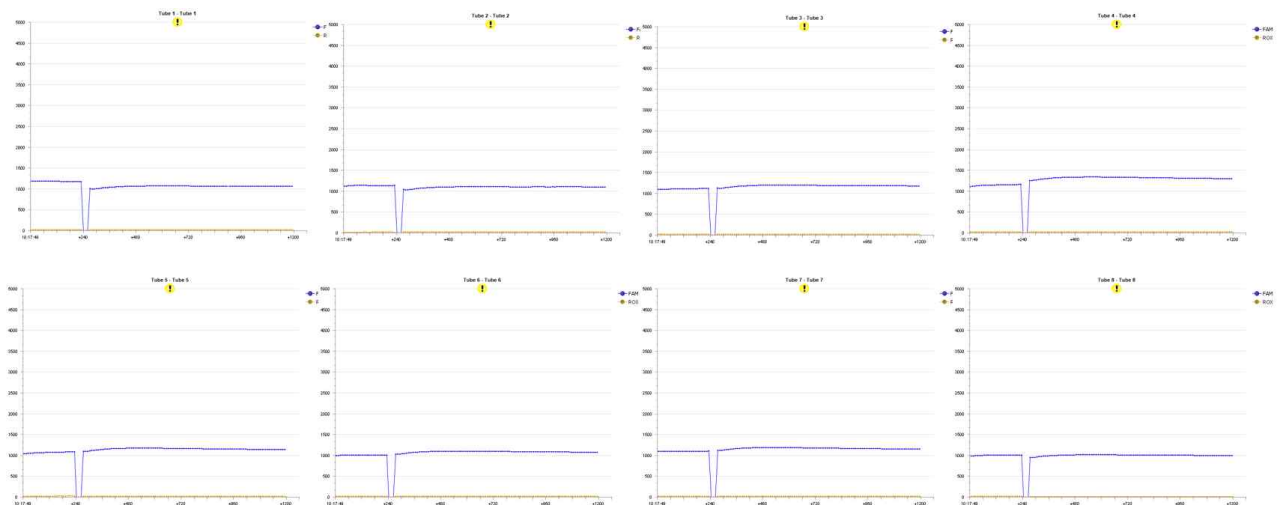
5'- AAGGATTTGAATTCATGCTGGCATAATTGTTGTAA -3'

<그림 1-156> RPA exo primer & probe set of ASPV isolates (No.3).

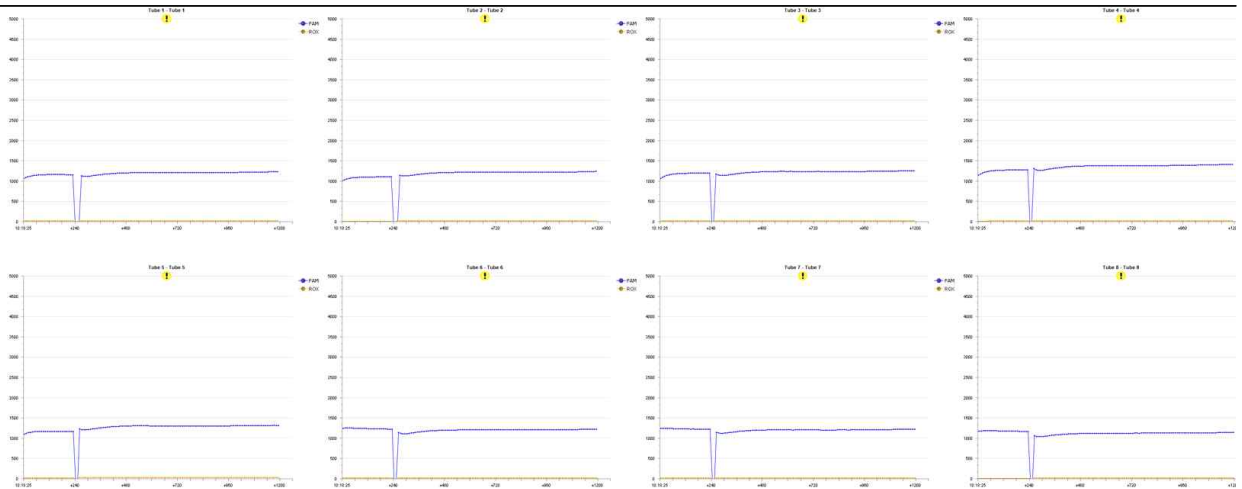


reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
ASPV3-135F	0.7 ul
ASPV3-337R	0.7 ul
ASPV3-193P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

No	3-5	3-6	3-7	3-8	사과1-	사과2-	사과3-	DW
결과	-	-	-	-	-	-	-	-



No	3-9	3-21	3-22	3-23	3-24	3-25	3-38	3-39
결과	-	-	-	-	-	-	-	-



No	3-40	3-41	3-42	3-58	3-59	3-60	3-61	3-62
결과	-	-	-	-	-	-	-	-

<그림 1-157> RPA exo reaction of primer & probe set of ASPV3 (No.3).

1. ASPV4-709F:

5'- CATCAACTCACAGAGGTTGGAGTCTATTTG - 3'

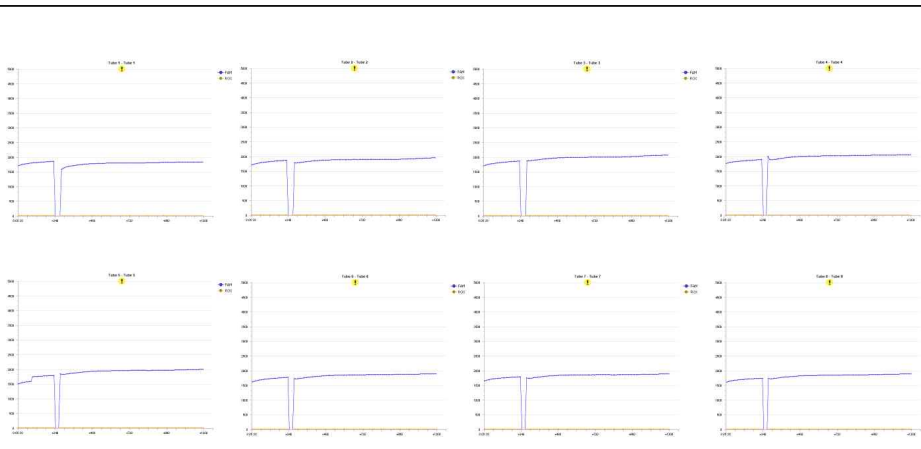
2. ASPV4-865P:

5'- GAG G CA GTA TTG TGC CTT TTA CGC AAA GCA [FAM-dT] G [THF] C
[BHQ1-dT] GGA ACC TCA TGC TGC- C3 Spacer

3. ASPV4-969 R:

5'- ATACCTAGTTTCAAATTTAAATTCTTTACCGACC -3'

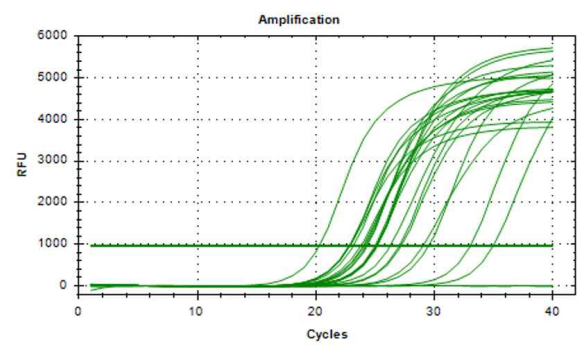
<그림 1-158> RPA exo primer & probe set of ASPV isolates (No.4).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
ASPV4-709F	0.7 ul
ASPV4-969R	0.7 ul
ASPV4-865P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

	3-5	3-6	3-7	3-8	사과1-	사과2-	사과3-	DW
	-	-	-	-	-	-	-	-

<그림 1-159> RPA exo reaction of primer & probe set of ASPV4 (No.4).



Reagent	Volume
2xOne Step TB green RT-PCR Buffer 4	5.0 ul
TaKaRa Ex Taq HS Mix	0.6 ul
ASPV F001	0.4 ul
ASPV R001-2	0.4 ul
Rox Ref Dye	0.2 ul
RT	0.2 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.2 ul
Total	10 ul

	3-5	3-6	3-7	3-8	사과1	사과2	사과3	DW
Ct	27.18	26.26	24.31	29.49	33.04	34.97	-	-
	3-9	3-21	3-22	3-23	3-24	3-25	3-38	3-39
Ct	29.05	25.10	24.01	22.86	25.01	25.12	25.18	24.23
	3-40	3-41	3-42	3-58	3-59	3-60	3-61	3-62
Ct	23.79	22.87	24.09	23.15	22.78	25.11	20.27	27.05

TB green RT-PCR	Time
42°C	5 min
95°C	10 sec
95°C	5 sec
60°C	30 sec

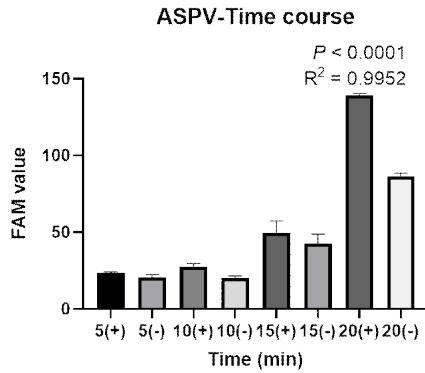
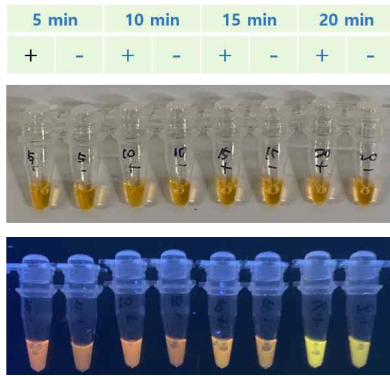
<그림 1-160> Real time PCR for ASPV infected samples.

- ASPV 유전자 30건에 대한 유전자를 분석한 결과 4개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-150, 151).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, ASPV gene의 중간부분에서 여러

개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 여러 가지의 프라이머 프로브 세트를 선정하여
인공합성하였다. 프라이머와 프로브들을 평가하였으나 그림 153 - 그림 159에서 보였듯 전
혀 반응이 없었다.

- Real time PCR로 RPA exo 반응에 사용한 ASPV 감염시료들을 평가한 결과, 시료들은 모두
잘 반응하고 있어 RPA probe와 primer 디자인에 실패한 것으로 결론을 내렸다 (그림
1-160).

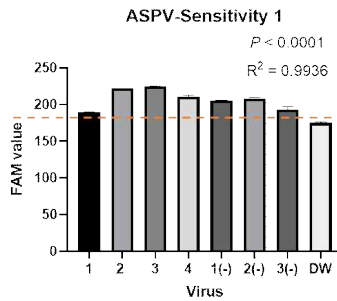
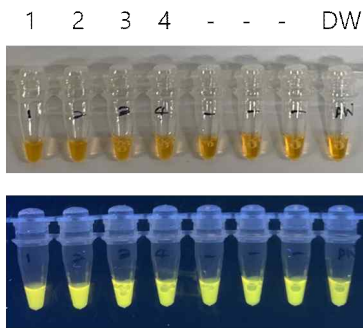
■ ASPV end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
ASPV F001	0.7 ul
ASPV R001-2	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

Time	5 min		10 min		15 min		20 min	
	+	-	+	-	+	-	+	-
FAM	24	22	29	21	55	47	172	113
	23	19	26	19	44	38	138	85

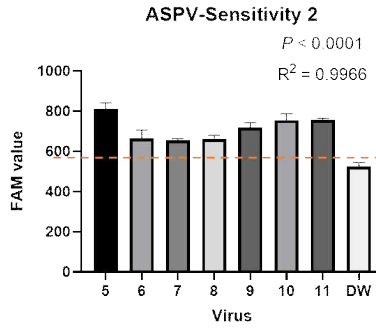
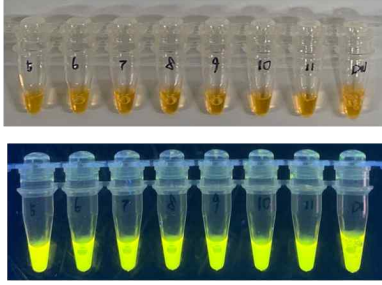
<그림 1-161> RPA end point reaction with primer set of ASPV according to the time.



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
ASPV F001	0.7 ul
ASPV R001-2	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

No	1	2	3	4	-	-	-	DW
FAM	189	222	224	210	205	207	190	174
	190	222	225	212	206	209	196	176

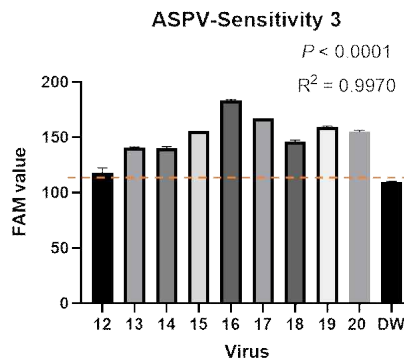
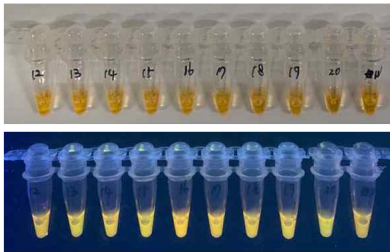
5 6 7 8 9 10 11 DW



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
ASPV F001	0.7 ul
ASPV R001-2	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

No	5	6	7	8	9	10	11	DW
FAM	792	694	651	649	736	778	751	538
	832	635	661	675	703	733	763	510

12 13 14 15 16 17 18 19 20 DW



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
ASPV F001	0.7 ul
ASPV R001-2	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

No	12	13	14	15	16	17	18	19	20	DW
FAM	121	141	141	156	184	167	147	159	156	110
	115	140	139	156	183	167	145	160	154	109

<그림 1-162> Sensitivity of RPA end point reaction with primer set of ASPV.

- ASPV를 RPA end detection kit로 검출하기 위해 F001 (AAGCATGTCTGGAACCTCATG)와 R001-2 (GATCAACTTACTAAAAAGCATAAGT)를 사용하여 증폭하고 syber green I을 첨가하여 결과를 확인하였다.
- RPA basic kit를 이용하여 F001/R001-2 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
- 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 10분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-161).
- ASPV end point detection kit의 민감도를 알아보기 위하여 20개의 양성 샘플과 3개의 음성 샘플을 검사한 결과, 모두 양성으로 검출되었다. 위양성이 많이 나타나고 음성대조군과의 차이도 크게 나지 않아 필드에서 쓰기에는 문제가 많은 키트로 사료되었다.

1. PLMVd-84F:

5'- TGAAAXXXXXCGAAACTCTTTTXXXXXATAAGTTT - 3'

2. PLMVd-250P:

5'- AAG CAC XXX GCA ATG XXX TAA GGT GGG XXX [FAM-dT] T [THF] CC
[BHQ1-dT] TCT XXX ACC XXX CGG - C3 Spacer

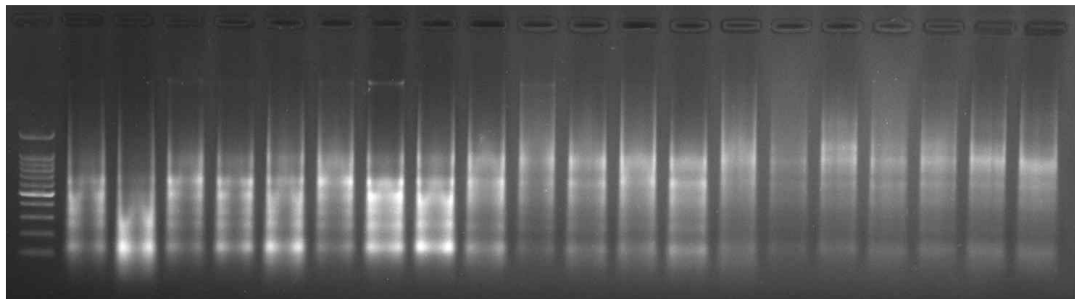
3. PLMVd-340R:

5'- GTAATXXXTTCTACGGCGXXXXTGGATCACAC -3'

<그림 1-167> RPA exo primer & probe sets of PLMVd isolates.

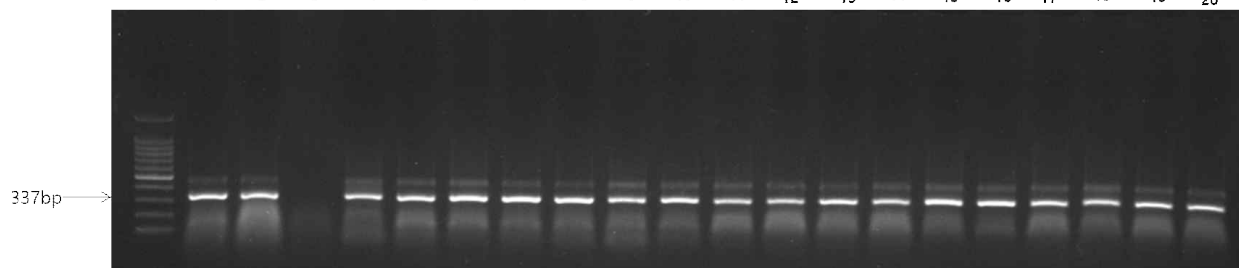
복숭아 시료 Total RNA extraction

M 복숭아 1 복숭아 2 복숭아 3 복숭아 4 복숭아 5 복숭아 6 복숭아 7 복숭아 8 복숭아 9 복숭아 10 복숭아 11 복숭아 12 복숭아 13 복숭아 14 복숭아 15 복숭아 16 복숭아 17 복숭아 18 복숭아 19 복숭아 20

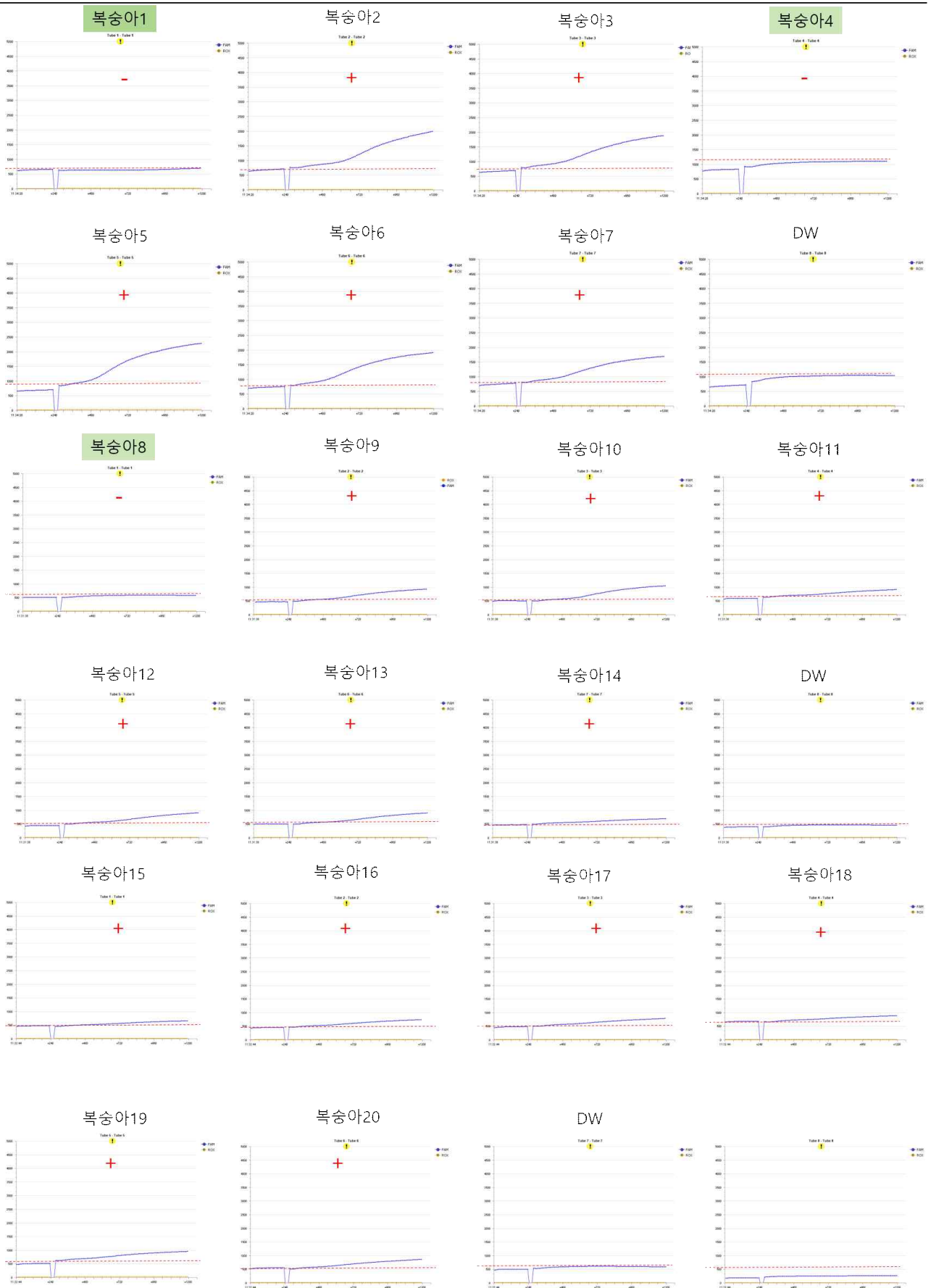


PLMVd 진단 RT-PCR

M 복숭아 1 복숭아 2 복숭아 3 복숭아 4 복숭아 5 복숭아 6 복숭아 7 복숭아 8 복숭아 9 복숭아 10 복숭아 11 복숭아 12 복숭아 13 복숭아 14 복숭아 15 복숭아 16 복숭아 17 복숭아 18 복숭아 19 복숭아 20



<그림 1-168> Gel electrophoresis of PCR reaction of PLMVd primer set for infected peach samples.

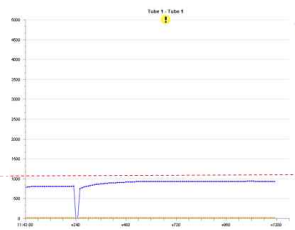


<그림 1-169> RPA Exo-RT reaction of PLMvd primer probe set with infected peach samples.

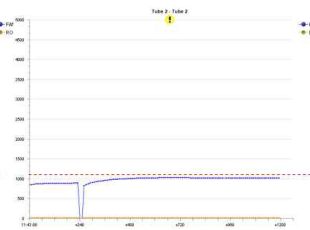
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
PLMVd-84F	0.7 ul
PLMVd-340R	0.7 ul
PLMVd-250P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	PLMVd DNA	Positive

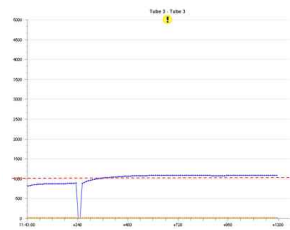
Brevibacterium casei



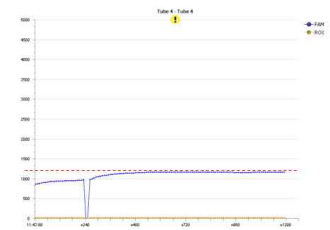
Micrococcus luteus



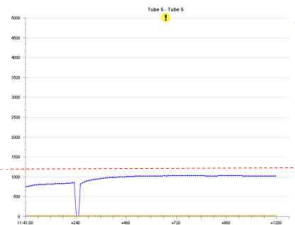
Streptococcus pyogenes



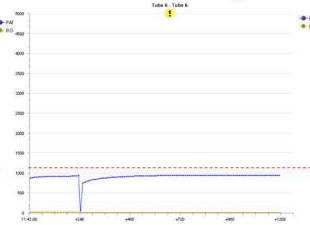
Streptococcus mitis/oralis



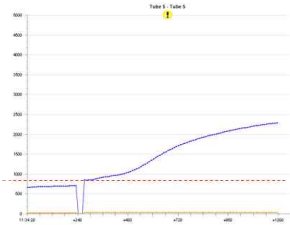
Serratia marcescens



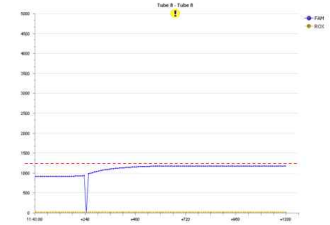
Enterobacter aerogenes

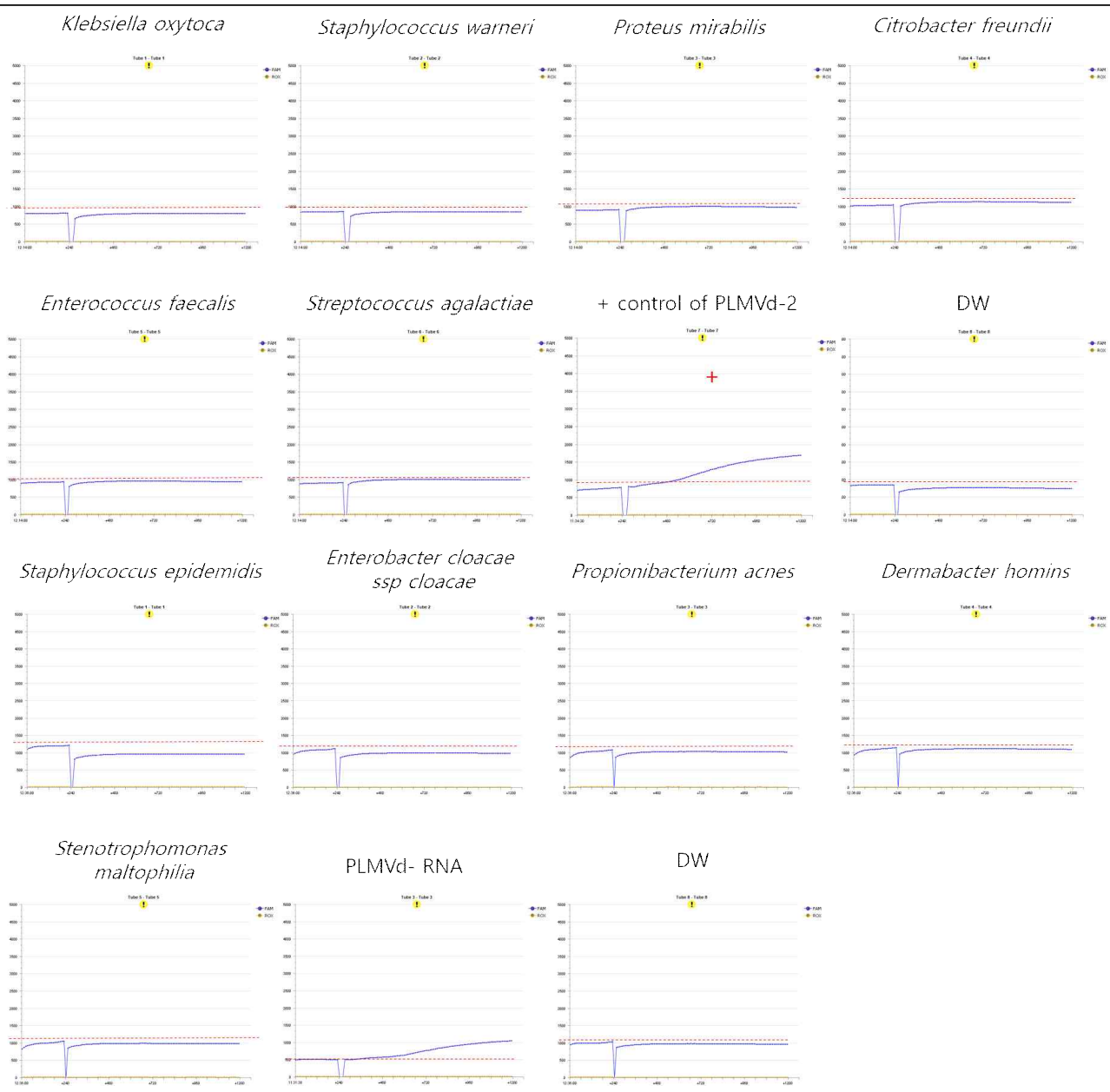


+ control of PLMVd-2



DW





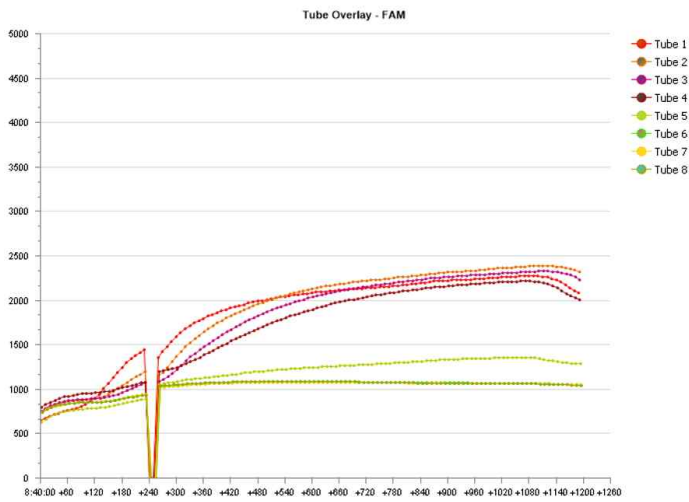
<그림 1-170> RT-RPA reaction of PLMVd primer probe set with several bacteria.

```

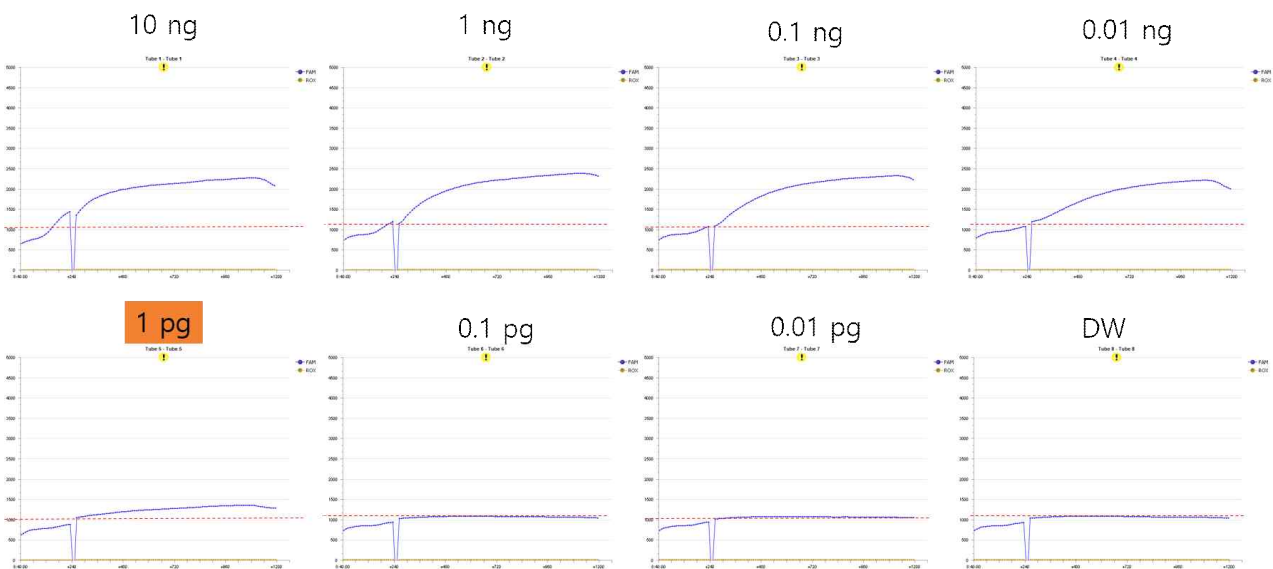
TCTCTGAAAXXXXCGAAACTCTTTTAACCCATAAGTTTCGCC
GTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGA
GAGAGTTGGTTACCXXXXXXXXXCTCCACCTTGGGGTGCCCTA
TTCGAAXXXXTG CAGGTCTCGATAGAAAGGCTAAGCACCT
CGCAATGAGGTAAGGTGGGACTXXXXXXCTGGAACCAAGC
GGTTGGTTCCGAGGGGGGTGTGATCCAGXXXXXGCCGTAGA
AACTGGATTAC

```

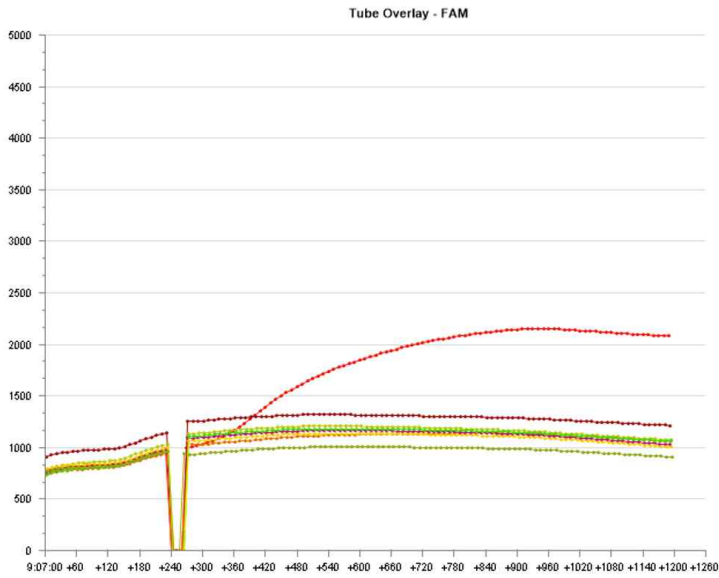
<그림 1-171> Synthetic target gene of PLMVd primer set.



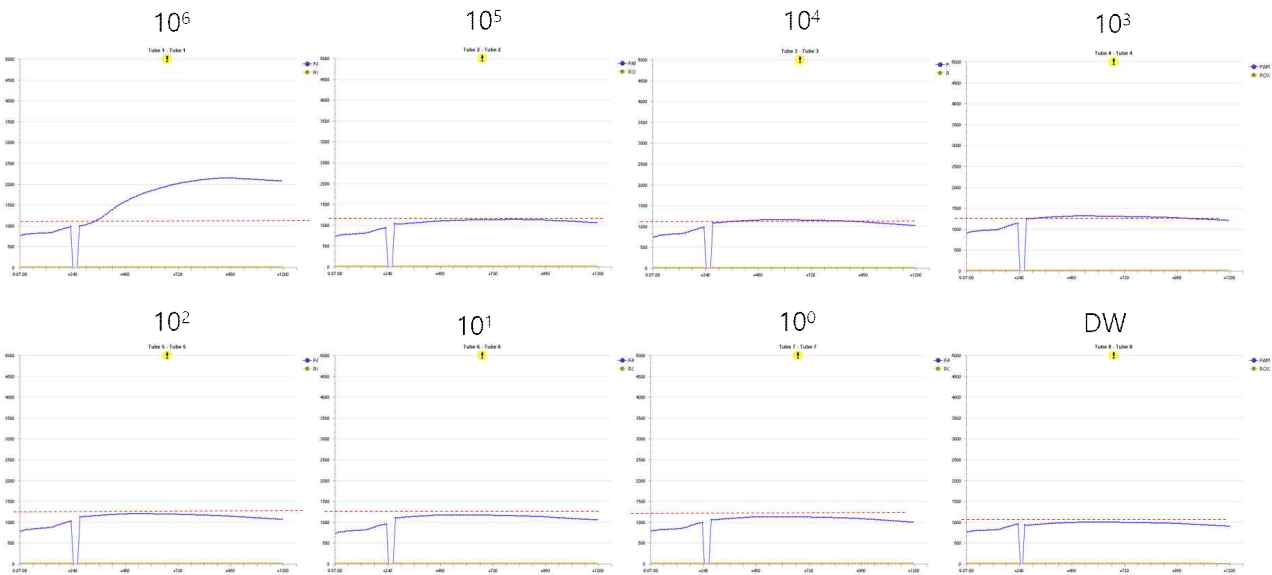
reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
PLMVd-84F	0.7 ul
PLMVd-340R	0.7 ul
PLMVd-250P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-172> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of PLMVd (Concentration).



reagent	volume
2x R Buffer	10 ul
100 mM dNTP	0.7 ul
10x B	2 ul
20x B	1 ul
50x B	0.4 ul
RT	0.4 ul
PLMVd-84F	0.7 ul
PLMVd-340R	0.7 ul
PLMVd-250P 1pM	0.3 ul
MgOAc	1.6 ul
RNA	1.0 ul
DW	1.2 ul
Total	20 ul



<그림 1-173> Limitation of Detection of RPA Exo-RT reaction with primer probe set of PLMVd (copies/ul).

- PLMVd 유전자 31건에 대한 유전자를 분석한 결과 3개의 subtype으로 나뉘었다 (그림 1-164, 165).
- Primer 3 프로그램을 이용하여 primer를 디자인 한 결과, PLMVd gene의 중간 영역에 여러

개의 프라이머와 프로브 세트가 생성되어 이중에서 하나의 프라이머 프로브 세트를 선정하여 인공합성하였다. 이 프라이머와 프로브 (Primer probe set; PLMVd-84F, PLMVd-250P, PLMVd-340R)(그림 1-166, 167)의 특성을 평가하였다.

- 전남대로부터 PCR 결과 양성으로 판정된 샘플과 음성 샘플 (그림 1-168)을 받아서 RT-RPA 반응을 관찰하였다. 19개의 양성 샘플 중에서 16개에 대하여 양성을 보였다. 민감도가 16/19 (84.2%)였다 (그림 1-169).
- 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-170).
- PLMVd primer probe set의 민감도를 측정하기 위하여 목표유전자를 인공합성하여 사용하였다 (그림 1-171).
- 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 1 pg까지 반응을 하였다 (그림 1-172).
- 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT RPA 반응을 39℃에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시킨 결과, 10^6 copies/ul 만 반응을 하였다 (그림 1-173).
- 이상의 결과로 RT-RPA PLMVd detection kit에 대한 시제품을 제작하였다 (그림 1-174).
- 키트안에 제품 사용 설명서 첨부하였다 (그림 1-175).
- PLMVd ER-Detection Kit 완제품을 주관연구기관인 (주)엘씨엠싸이언스의 홈페이지에 게재하여 판매를 개시하였다 (2022. 09, 그림 1-176).



<그림 1-174> PLMVd ER Detection kit.

LCM Science Co., Ltd

LCM-PLMVd-ER-50

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit

50 rxn

Revision No.: LCM-PLMVd-ER-0001
Issue Date: Jul 25, 2022
User Manual
For Research Use Only

Manufactured by LCM Science Co., Ltd
Tel: +82-02-1588-3546 www.vuglobal.wavework.kr_nova3546@lcmscience.co.kr
161-10 Baekto-ri Hyangnam-eup Hwasong-si Gyeonggi-do South Korea.
Technical Support by SpeegeneBio Co., Ltd
Tel: +82-31-8018-2150 speegene@gmail.com

1. General Information

The isothermal TwistAmp technology is based on the Recombinase Polymerase Amplification (RPA) process developed by TwistDx Ltd. The amplification products generated by RPA can be detected in real time by probe-based fluorescence monitoring.

2. Storage conditions

The kit should be kept -20°C (Full activity is guaranteed for 6 months).

3. Application

The Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection kit contains specially designed probe and primer set for amplification of PLMVd gene to detect the PLMVd viral RNA from specimens.

4. Product Description

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) is a species of the genus Pelamoviroid, which belongs to the family Avsunviroidae. This family is characterized as having chloroplastic viroids with hammerhead ribozymes. Peach latent mosaic viroid is a 336-351nt circular RNA which has a branched formation. This branched formation is stabilized by a pseudoknot between two kissing loops. Peach latent mosaic viroid was first described in the 1980s in Spain by a group of scientists.

It is present in all peach- and nectarine-producing areas of the world including Europe, Asia, North America and South America and the frequency of naturally occurring infection is high. Before the development of symptoms the disease is latent in peach trees for approximately 5-7 years. The symptoms of the disease include necrosis of buds, delayed shoot development, necrotic branches, premature ageing of trees, flower streaking, ripening deformations, enlarged rounded stones, circular discoloured areas on the fruit skin and in some cases mosaic, blotch, vein banding or calico appearance on infected leaves.

The Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection kit contains a specific ready-to-use system for the detection of the Peach latent mosaic viroid by newly developed isothermal gene amplification technology, called RPA method (TwistDx Ltd). The master contains enzymes and reagents including specific probe and primer sets which is specially designed to amplify the PLMVd gene for the unique amplification of Peach latent mosaic viroid RNA within 15-20 min.

5. Kit Contents

Number	Name of Reagent	CAP	Qty / 50 rxns
1	PLMVd Enzyme Master Mix	ENZ	1 vial, 780 µl
2	PLMVd Probe	PRO	1 vial, 80 µl
3	PLMVd Primer Mix	PRM	1 vial, 70 µl
4	280 mM Magnesium acetate	Mg	1 vial, 90 µl
5	PLMVd Positive control	POS	1 vial, 50 µl
6	Molecular Grade Water	DW	1 vial, 1 ml

6. Required Materials and Devices

Real time PCR system or T8 (or T16) UV scanner /CFX96 real time PCR/ Biological cabinet / Vortex mixer / Micropipets (0.5 – 1000 µl) / Sterile filter tips (10, 20, 200, 1000 µl) / Sterile microtubes / Refrigerator / Freezer / Tube racks / Microcentrifuge / Biohazard waste container

7. Procedure

7.1 Viral RNA-Extraction

- Viral RNA extraction kits are available from various manufactures. You can use your own extraction systems or commercial kits.

7.2. RPA reaction

No	Reagent	1 rxn	8 rxn
1	PLMVd Enzyme Master Mix	14.0 µl	112 µl
2	PLMVd Probe	1.5 µl	12.0 µl
3	PLMVd Primer Mix	1.4 µl	11.2 µl
4	280 mM Magnesium Acetate	1.6 µl	12.8 µl
5	RNA	1.0 µl	X µl
Total		20.0 µl	160.0 µl

- * Use the reagents which are stored at -20°C after spin down briefly when those are melted before use.
- * Be careful of contamination when you use the positive control for amplification.

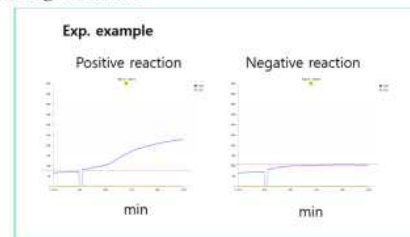
- Please make the reaction mixture on ice. Mix well the reagents according to the table below.
- Mix well by tapping 5 times or vortexing briefly and then spin down.
- Aliquot 19 µl of master mixture to each PCR tube.
- Add positive and negative control (DW) to each PCR tube.
 - * It is highly recommended that the mixture for negative control should be made separately to avoid cross contamination.
- Close the lid of PCR tube and then spin down briefly to remove the bubble.
- Real time RT-RPA reaction should be done at least 20 min.
- Set the program as below table.

Step	No. of Cycle	Temperature	Duration
1	40	37-40°C	30 sec

8) Plate setup

- Set the fluorophores with FAM.
- Type the sample names in the each tube.
- * Unknown: clinical sample
- * Negative control
- * Positive control

8. Reading the Result



<Example of PLMVd RT-RPA reaction at T8 UV scanner>

Case	Positive control	Negative control	PLMVd RNA	Interpretation (Ct value)
1	+	-	+	PLMVd Positive
2	+	-	-	PLMVd Negative
3	+	+	+/-	Invalid result / retest
4	-	+	+/-	
5	-	-	+/-	

9. Warnings and Precaution

- For research use only.
- Carefully read this instruction before starting the procedure.
- Clinical samples should be regarded as potentially infectious materials and prepared the RPA reaction mixture in a laminar flow hood.
- Do not use the kit after its expiration date written on box.
- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents, this may cause wrong test result.
- Once the reagents have been thawed, vortex, and spin down briefly the tubes before use.
- Prepare quickly the reaction mixture on ice.
- Use always sterile pipette tips with filters.
- Wear separate coats and gloves in each area.
- Collected test samples in sterile tubes.
- Test samples should be extracted immediately or frozen at -20°C to -80°C.

LCM SCIENCE
LABORATORY EQUIPMENT

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) 복숭아 잠재 모자이크 바이로이드



1. 기온이 높고 습도가 높을 때 바이러스의 발생을 촉진하여 과실의 과육에 바이러스 증상을 나타내며 과실의 과육이 갈라지는 현상도 발생한다.
2. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.
3. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.
4. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.
5. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.
6. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.
7. 과실의 과육이 갈라지는 현상은 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하며 과실의 과육이 갈라지는 현상과 유사하다.

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit는
강렬한 직광으로 부터 PLMVd를 검출하여 광장분석하는 연구용 제품입니다.

LCM SCIENCE
LABORATORY EQUIPMENT

사용 목적

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit는 TwistDx Ltd 에서 개발한 RPA (Recombinase Polymerase Amplification)를 기반으로 한 제품입니다. RPA에서 생성된 증폭 산물은 프로브 기반 형광 모니터를 통해 실시간으로 PLMVd를 검출하는 분자진단제입니다.

제품특징

- * 20분내 빠른 검사 결과 확인
- * 간편한 사용법
- * 빠른 시간대비 높은 민감도
- * 사용자들 위한 동영상 제공 (준비중)

LCM SCIENCE
LABORATORY EQUIPMENT

제품 스펙

경제	SYMMV 감염의심 작물			
검사시간	15-20분 (핵산추출시간 제외)			
민감도	90%			
특이도	100%			
보관온도	-20℃			

주문 정보

Cat. No.	제품명	보관온도	Test/Kit	가격
LCM-PLMVd-ER-50	Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER- Detection Kit	-20℃	50T/Kit	₩600,000 (VAT 별도)

제품설명서



LCM SCIENCE
LABORATORY EQUIPMENT

<그림 1-176> Contents of PLMVd ER Detection kit in LCM science homepage (www.lcmscience.co.kr).

■ PLMVd nfo detection kit - 공동연구기관 - 강원대 결과

1. PLMVdnfo-84F:

5'- TGAAATXXXXCGAAACTCTTTXXXXXXATAAGTTT - 3'

2. PLMVdnfo-250P:

5'- [FAM] AAG CAC XXX GCA ATG XXX TAA GGT XXX ACT TT [THF] CC
TTCT XXX ACC XXX CGG - C3 Spacer

3. PLMVdnfo-340R:

5'- [Biotin]GTAAXXXGTTTCTXXXGCGGTACXXXGATCAXXX -3'

<그림 1-177> RT-RPA nfo primer probe set of PLMVd.



Reagent	Volume	x8
R.Buffer	29.5 ul	240
PLMVdnfo 84F	2.1	16.4
PLMVdnfo-250P	0.5	4.0
PLMVdnfo-340R	2.1	16.4
RT	1.0	8.0
RNA	2.0	-
DW	10.3	82.4
MgOAc	2.5	20
Total	50 ul	48 ul

No. 2



7	8	9	10	11	12	13	DW
+	+	+	+	+	+	+	-

No. 3

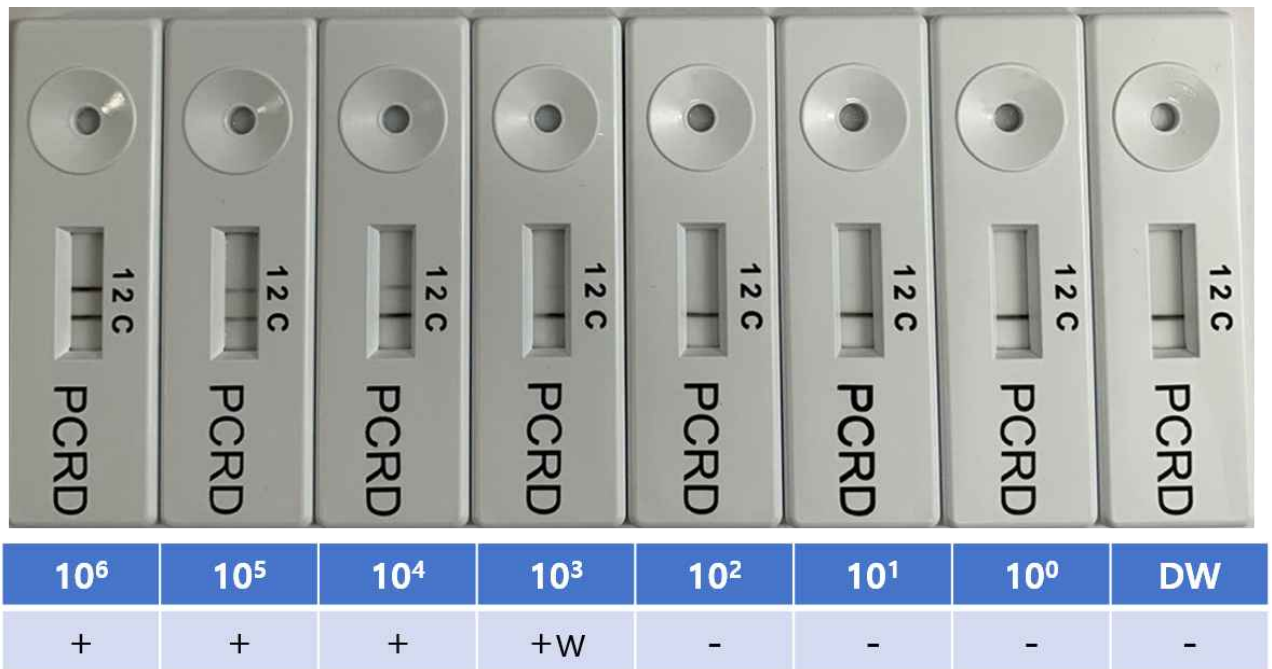


14	15	16	17	18	19	20	DW
+	+	+	+W	+	+	+	-

<그림 1-178> RT-RPA nfo reaction with several PLMVd infected samples.



<그림 1-179> Sensitivity of PLMVdnto primer and probe (concentration).

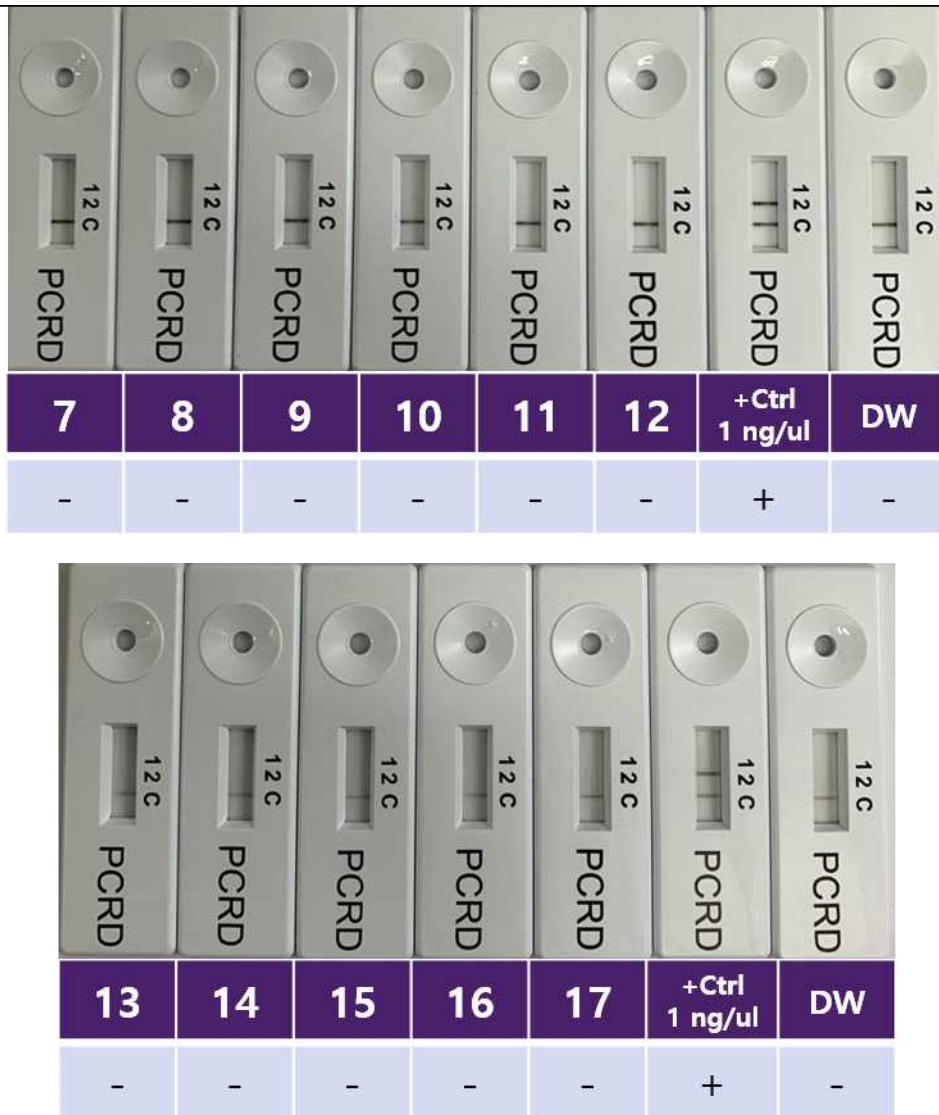


<그림 1-180> Sensitivity of PLMVdnto primer and probe (copies/ul).

Reagent	Volume
R.Buffer	29.5 ul
PLMVdnfo 84F	2.1
PLMVdnfo-250P	0.5
PLMVdnfo-340R	2.1
RT	1.0
RNA	2.0
DW	10.3
MgOAc	2.5
Total	50 ul

No	Bacteria	result
1	<i>Brevibacterium casei</i>	Negative
2	<i>Micrococcus luteus</i>	Negative
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Negative
4	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Negative
5	<i>Serratia marcescens</i>	Negative
6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Negative
7	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negative
8	<i>Staphylococcus warneri</i>	Negative
9	<i>Proteus mirabilis</i>	Negative
10	<i>Citrobacter freundii</i>	Negative
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Negative
12	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Negative
13	<i>Staphylococcus epidemidis</i>	Negative
14	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	Negative
15	<i>Propionibacterium acnes</i>	Negative
16	<i>Dermabacter hominis</i>	Negative
17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Negative
18	Distilled water	Negative
Positive control	PLMVd - mRNA transcript	Positive





<그림 1-181> Specificity of PLMVdVnfo primer and probe against the several genome of bacteria.

- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT PLMVd primer & probe set를 응용하여 PCR nucleic acid detector를 이용한 육안 결과 관찰이 가능한 nfo primer probe를 합성하였다 (그림 1-177).
- 해당 바이러스의 핵산을 nfo kit의 master mix에 1 ul 넣고 39℃에서 15분-20분간 반응시킨 후 PCR 샘플 주입구에 10 ul 넣고 90 ul wash buffer로 흘려주면서 결과를 관찰하였다.
- 19개의 양성샘플에 대한 RPA nfo 반응을 확인한 결과, 18개가 양성을 보여 94.7%의 민감도를 보였다 (그림 1-178)

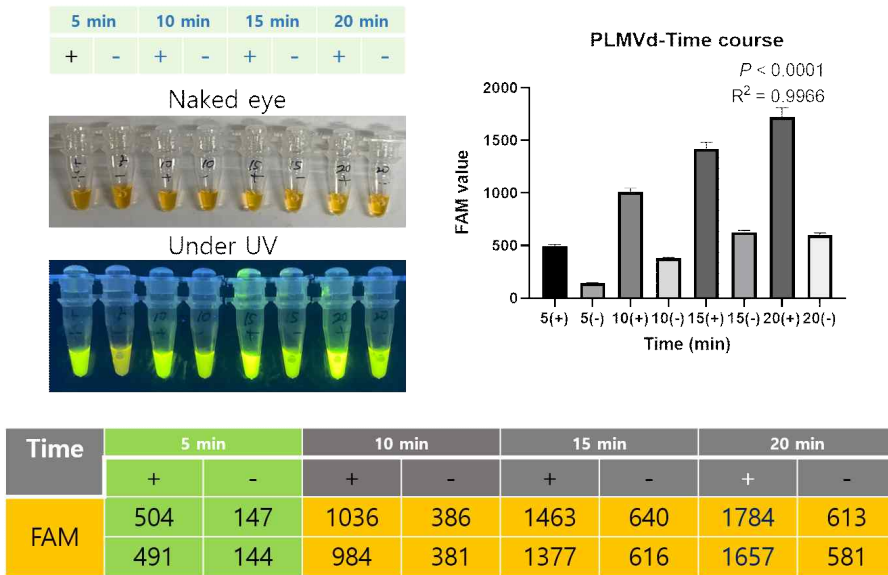
-
- 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

 - 목표유전자를 10 ng부터 0.01 pg까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 0.01 pg 까지 반응을 하였다 (그림 1-179).

 - 목표유전자를 10^6 부터 10^0 까지 10배 희석하여 Exo RT nfo RPA 반응을 39°C에서 20분간 T-8 UV Scanner에서 반응시키고 나서 10 ul 반응액을 PCRD nucleic acid detector에 넣고 extraction buffer를 흘려보내면서 결과를 관찰하였다. 그 결과 1000 copies/ul 까지 반응을 하였다 (그림 1-180).

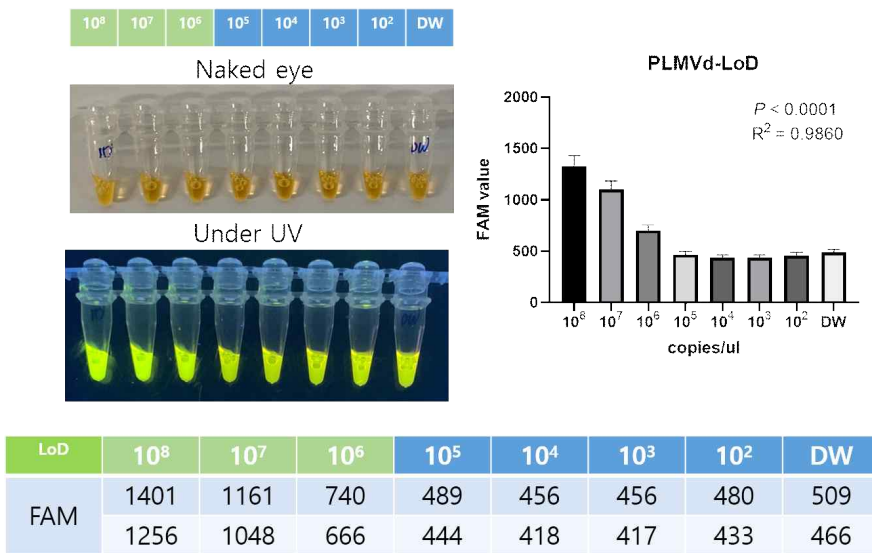
 - 실험실 환경 혹은 실험자로부터 검출될 가능성이 높은 17종의 박테리아의 유전자와의 반응성을 확인해 본 결과, 단 한 개의 박테리아와도 반응하지 않았다 (그림 1-181).

■ PLMVd end point detection kit - 위탁연구기관 - 전남대 결과



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PLMVdnfo-84F	0.7 ul
PLMVdnfo-340R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

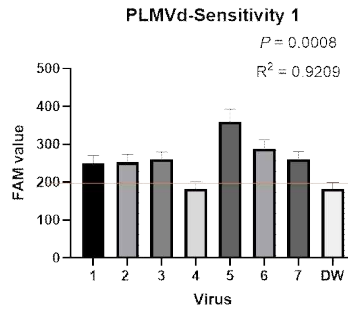
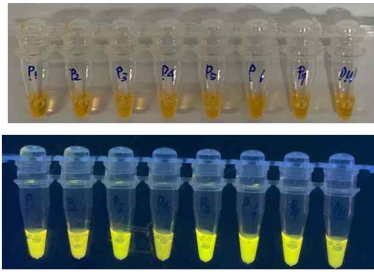
<그림 1-182> RPA end point reaction with primer set of PLMVd according to the time.



Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PLMVdnfo-84F	0.7 ul
PLMVdnfo-340R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

<그림 1-183> Limitation of detection of RPA end point reaction with primer set of PLMVd (copies/ul).

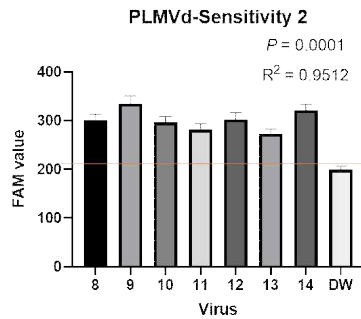
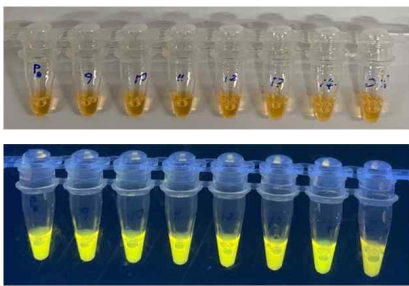
1 2 3 4 5 6 7 DW



No	1	2	3	4	5	6	7	DW
FAM	264	268	274	196	383	305	275	194
	235	238	248	170	336	272	246	171

Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PLMVdnfo-84F	0.7 ul
PLMVdnfo-340R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

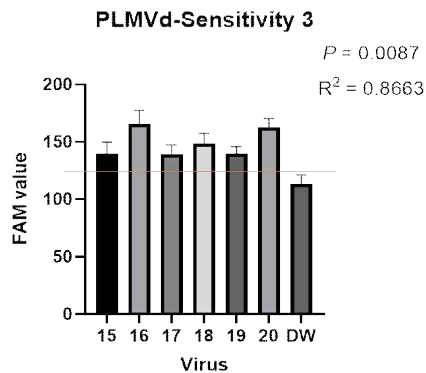
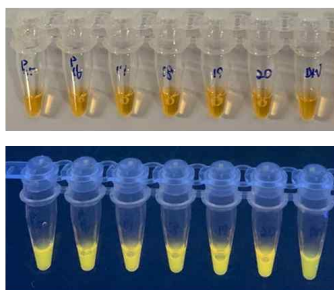
8 9 10 11 12 13 14 DW



No	8	9	10	11	12	13	14	DW
FAM	309	346	305	290	312	280	330	205
	291	324	287	273	292	266	313	194

Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PLMVdnfo-84F	0.7 ul
PLMVdnfo-340R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

15 16 17 18 19 20 DW



No	15	16	17	18	19	20	DW
FAM	147	174	145	155	144	168	119
	133	157	133	142	135	157	108

Reagent	Volume
2x RB	10 ul
100mM dNTP	0.6 ul
10x E. Mix	2.0 ul
20x core Mix	1.0 ul
PLMVdnfo-84F	0.7 ul
PLMVdnfo-340R	0.7 ul
RT	0.5 ul
MgOAC	1.0 ul
RNA	1.0 ul
DW	2.5 ul
Total	20 ul

<그림 1-184> RPA end point reaction with field samples infected with PLMVd.

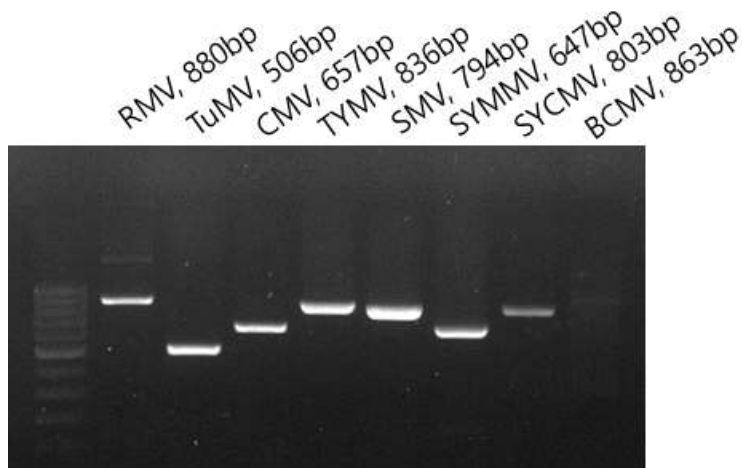
-
- 엘씨엠싸이언스에서 개발한 Exo RT PLDVd primer & probe set를 응용하여 syber green I을 이용한 end point detection kit를 제작하였다.
 - RPA basic kit를 이용하여 nfo kit에 사용한 primer set로 master mix 만들고 각각의 핵산 샘플을 1 ul 넣고 39°C에서 반응시켰다.
 - 시간별로 RPA반응을 관찰한 결과, 5분후 부터 양성반응을 보이기 시작하였다 (그림 1-182).
 - 최소검출한계를 알아보기 위하여 인공합성한 양성대조군을 10^6 - 10^0 copies/ul까지 단계적 희석한 후 39°C에서 15분간 반응시키고 사이버그린으로 발색을 한 후 HARU-2000으로 FAM값을 측정하였다. 그 결과 10^6 copies/ul까지 검출이 되었다 (그림 1-183).
 - 19개의 양성샘플에 대한 RPA nfo 반응을 확인한 결과, 19개가 양성을 보여 100%의 민감도를 보였다 (그림 1-184)
 - 음성대조군인 증류수는 반응하지 않았다.

■ 공동연구기관-강원대 추가 연구결과

1. 진단 대상 식물바이러스 수집, 바이러스 핵산 분리 및 보관
(RMV, TuMV, TYMV, BCMV, SMV, SYCMV, SYMMV, ASPV, PLMVd)

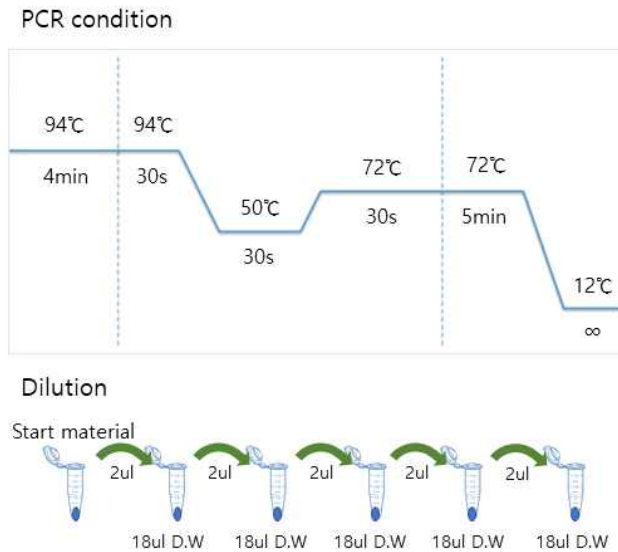
표 강-1. 검정용 프라이머 목록

Virus	Primer	Sequence (5' → 3')
RMV	TobamodF	TKG AYG GNG TBC CNG GNT GYG G
	TobamodR	ACN GAV TBN ABC TGT AAT TGC TAT
TuMV	TuMV-CP(506)-5	AAT GTG GGT GAT GAT GGA CGG
	TuMV-CP(506)-3	CAC ACT GGC TGC TTT AAC AAA C
TYMV	TYMV-CP-5456F	CTC AGC CTC CTC GAA CGA
	TYMV-CP-6292R	CGG GAG TTG CAC CCG ATT A
CMV	CMV-Fny-CP-5'	ATG GAC AAA TCT GAA TCA ACC AG
	CMV-Fny-CP-3'	TCA GAC TGG GAG CAC TCC A
SMV	SMV-8535F1	TCA GGC AAG GAG AAG GAA GGA GA
	SMV-9329R1	CTG CGG TGG GCC CAT GC
SYMMV	SYMMV-2664F1	ATG AAT GGA AAA ATG CTC ACC ATT G
	SYMMV-3311R1	TGA AGC TTG CTG TCC ATA TGC TG
SYCMV	SYCMV-3227F1	ATG GCG AAG AGG CTA ACC AAA CA
	SYCMV-4030R1	TCA GTT GTT CAA GGC TGA GGC G
BCMV	BCMV-8876F1	TCA GGA ACT GGA CAG CCA CAG C
	BCMV-9739R1	TTA CTG CGG GGA GCC CAT G

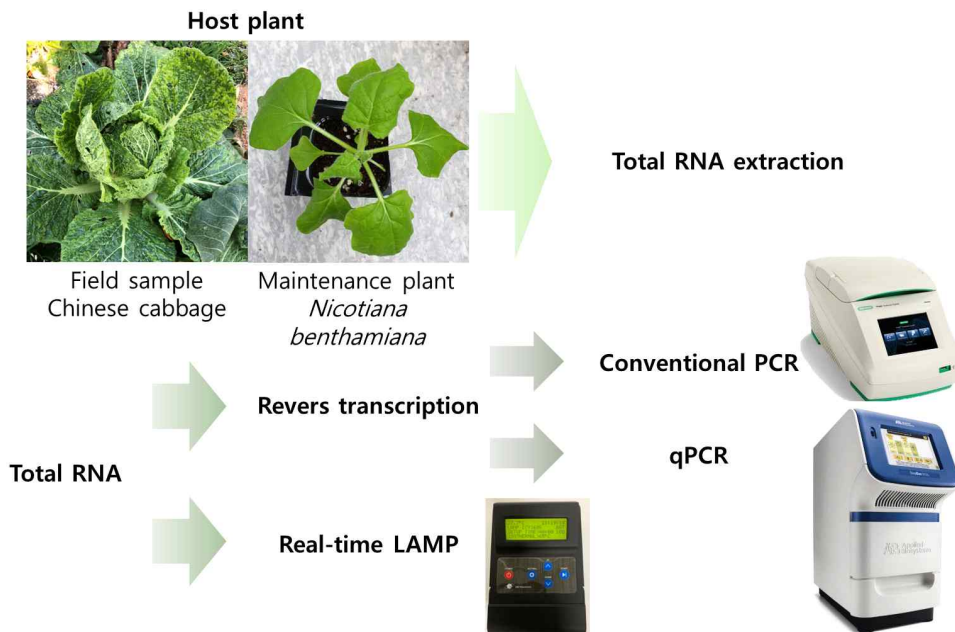


<그림 강-1> 진단 대상 식물바이러스의 핵산 검정

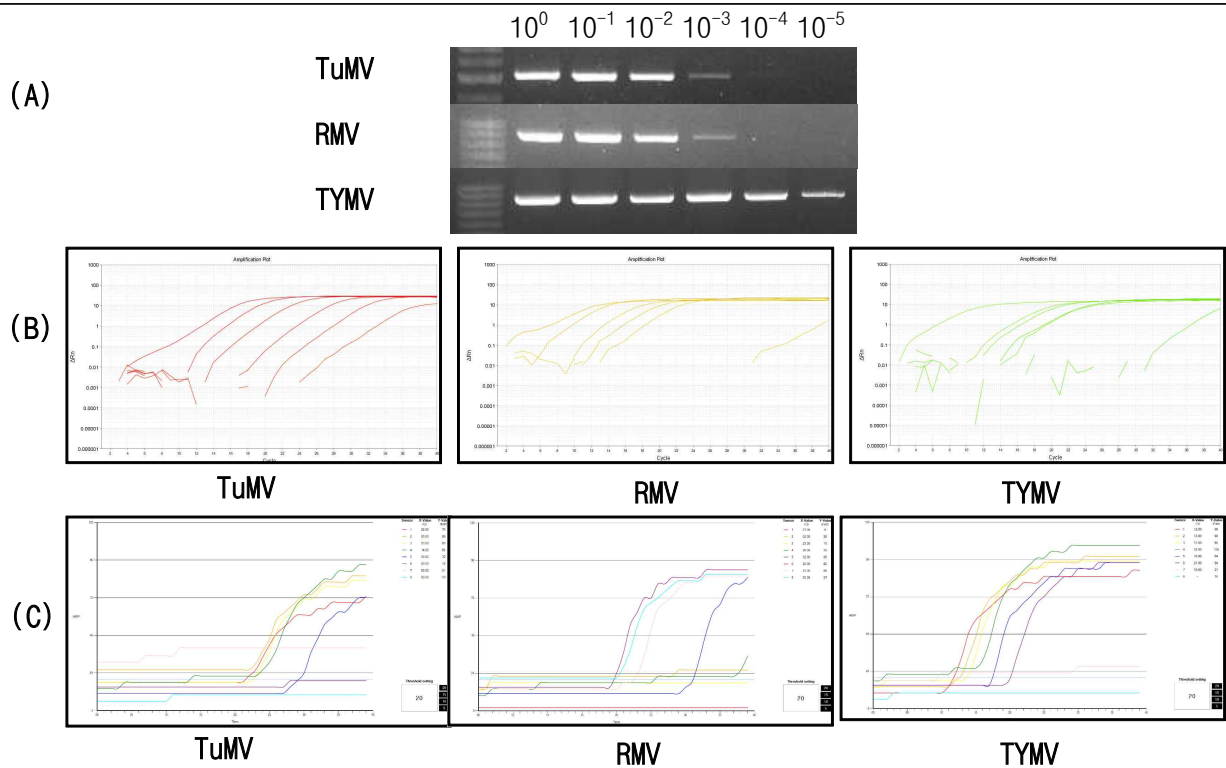
○ 당해연도 대상 식물 바이러스인 RMV, TuMV, TYMV, BCMV, SMV, SYMMV, SYCMV에 대하여 바이러스원을 확보하고 검정용 프라이머를 디자인하였으며, 핵산을 추출하여 바이러스를 검정하였다. 확인된 바이러스 핵산은 이후 실험의 재료로 활용되었다.



<그림 강-2> 진단 대상 식물바이러스의 기존 진단 방법 (RT-PCR, RT-qPCR)과 Real-time LAMP 민감도 비교를 위한 PCR 조건 및 10배 희석방법



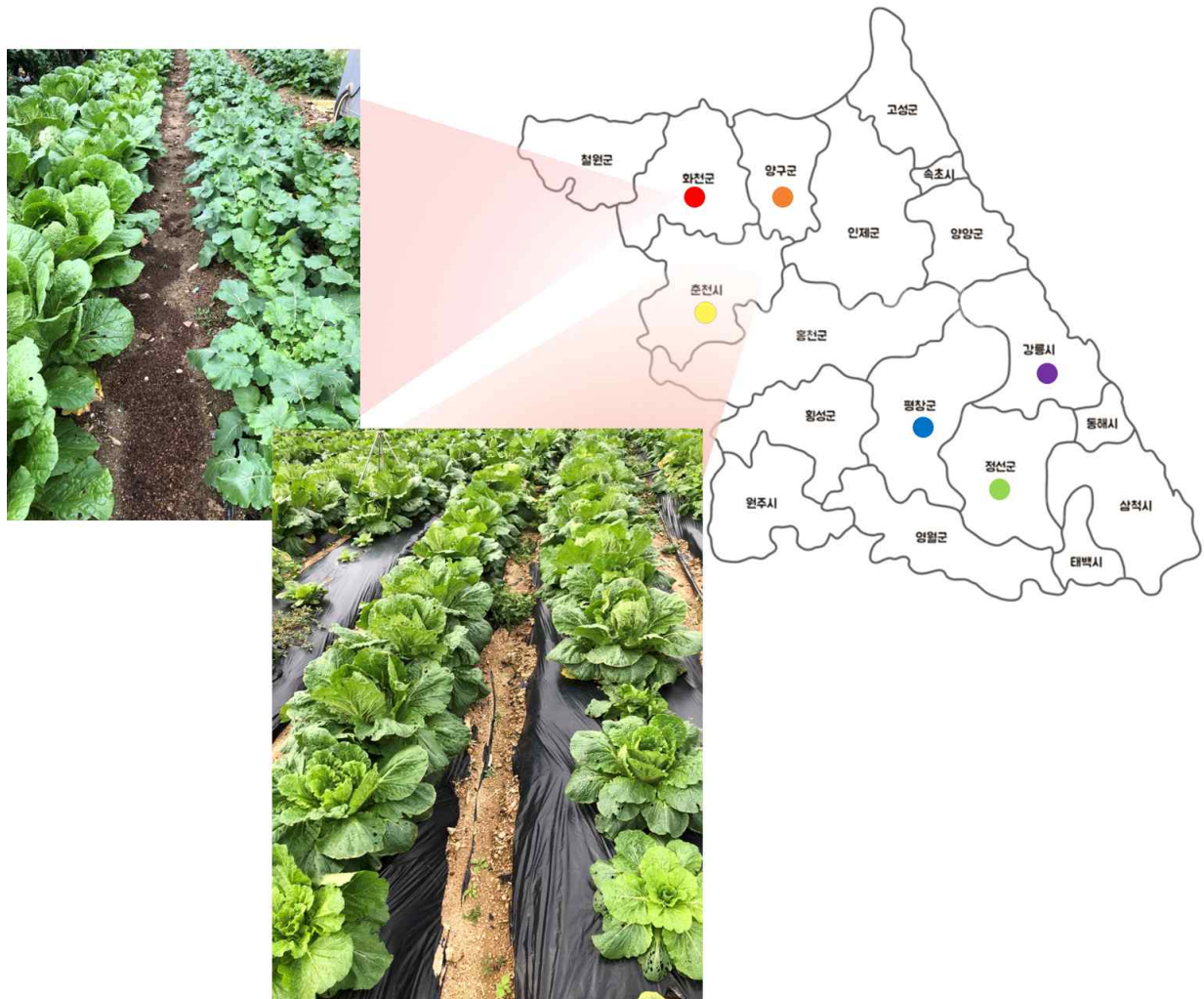
<그림 강-3> 진단 대상 식물바이러스의 기존 진단 방법 (RT-PCR, RT-qPCR)과 Real-time LAMP 민감도 비교를 위한 전체적인 실험 과정



<그림 강-3> 진단 대상 식물바이러스의 기존 진단 방법 (RT-PCR, RT-qPCR)과 Real-time LAMP를 통한 민감도 비교 분석. (A) conventional RT-PCR, (B) RT-qPCR, (C) Real-time LAMP

- 배추 대상 감염 바이러스인 TuMV와 RMV, TYMV를 대상으로 LCM사이언스에서 개발된 real-time LAMP 진단 키트와 기존 검정방법인 RT-PCR과 Real-time PCR을 이용하여 민감도를 비교하고자 하였다.
- 각 바이러스는 식물로부터 Total RNA를 추출하여 평준화 한 뒤, 10배 희석을 통해 10^0 부터 10^5 까지 검정을 진행하였다.
- 필드 샘플의 경우 식물로부터 Total RNA를 추출하여 역전사 반응 및 Real-time LAMP를 수행 하였으며, 역전사 이후 PCR과 qPCR을 진행하였다.
- 기존 진단 방법인 RT-PCR의 경우 가장 낮은 검출 한계를 보였으며, Real-time PCR 및 Real-time LAMP는 유사한 수준의 검출 한계를 보였다.
- 새로 개발된 Real-time LAMP 키트는 RNA수준에서 바로 검정이 가능하였으나, RT-PCR 및 Real-time PCR의 경우 역전사 반응이 필수적이며, 그 소모시간 또한 Real-time LAMP의 40분 (total RNA 추출 시간은 제외한다) 에 비해 Real-time PCR은 약 4.5배, RT-PCR은 5배 이상의 시간이 필요하였다.

2. 농가포장시료에 대한 진단검사 및 유용성 평가



<그림 강-4> 강원도 배추 및 무 농가포장시료 채집

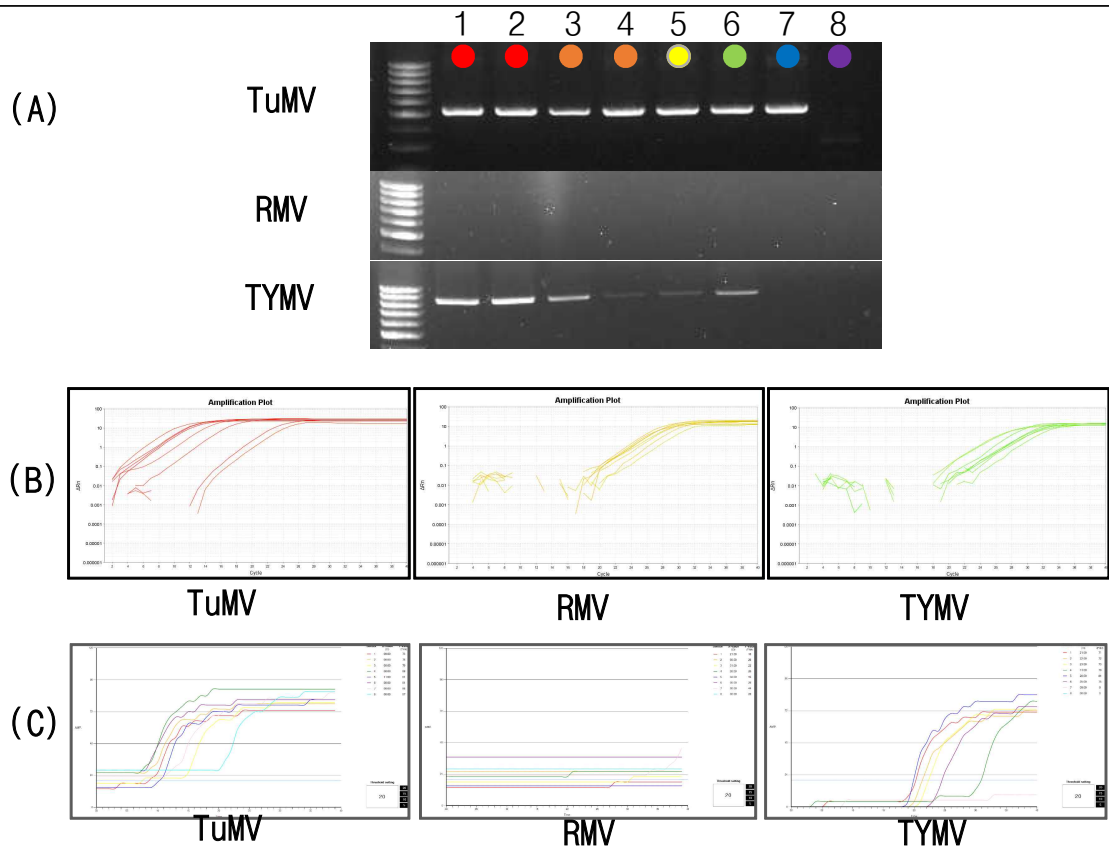


B

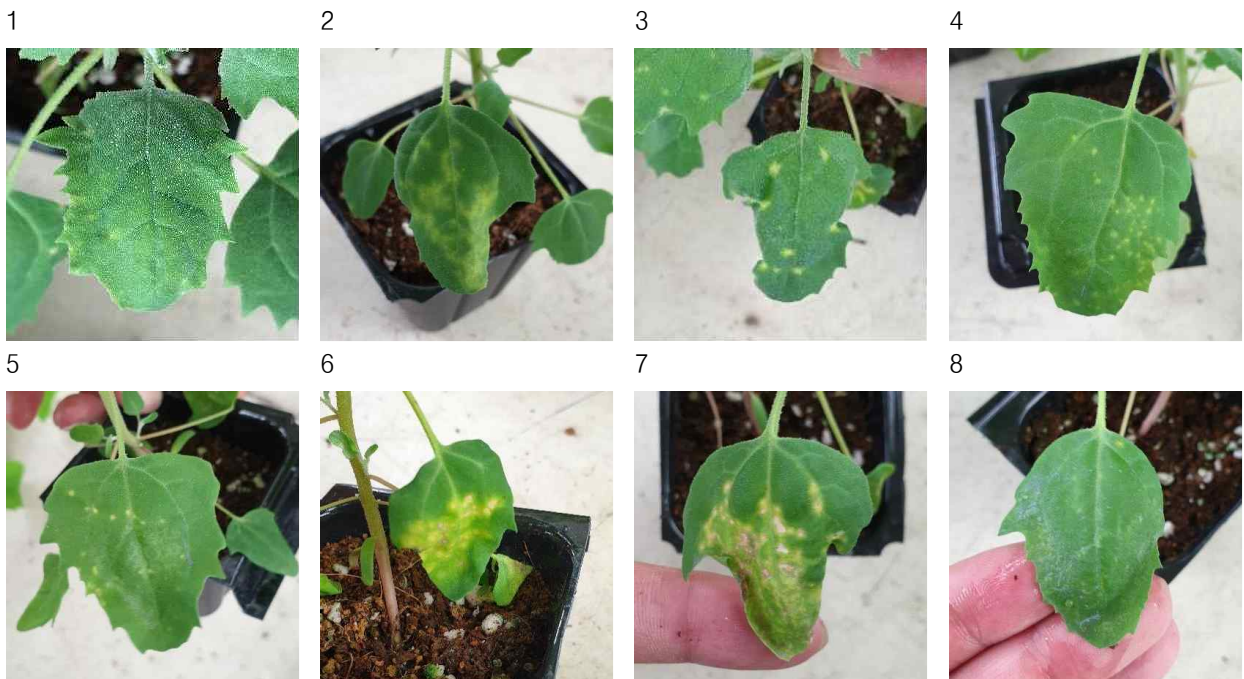


<그림 강-5> 강원도 배추 및 무 포장에서 채집한 배추와 무 샘플의 바이러스성 병징. (A) 화천 포장, (B) 양구 포장

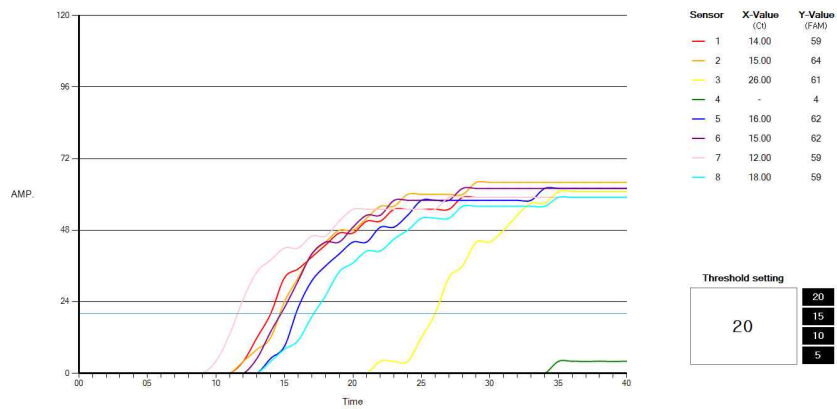
- 농가포장시료에 대한 진단검사 및 유용성 평가를 위해 강원도의 6개 시군에서 바이러스성 병징을 나타내는 배추를 채집하였다. 또한 대상 작물인 배추 외에 배추와 같은 바이러스병을 공유하는 무를 채집하여 이후 실험에 사용하였다.
- 채집된 샘플은 심한 바이러스 병징을 나타냈으며, 증상은 심한 모자이크와 약한 모자이크, 모틀, 황화, 위축 등 다양했으며, 그 상품 가치가 저해되어 피해가 심각하였다.



<그림 강-6> 농가포장시료를 대상으로 기존 검정방법 (RT-PCR, RT-qPCR)과 Real-time LAMP를 이용한 비교 진단. (A) conventional RT-PCR, (B) RT-qPCR, (C) Real-time LAMP

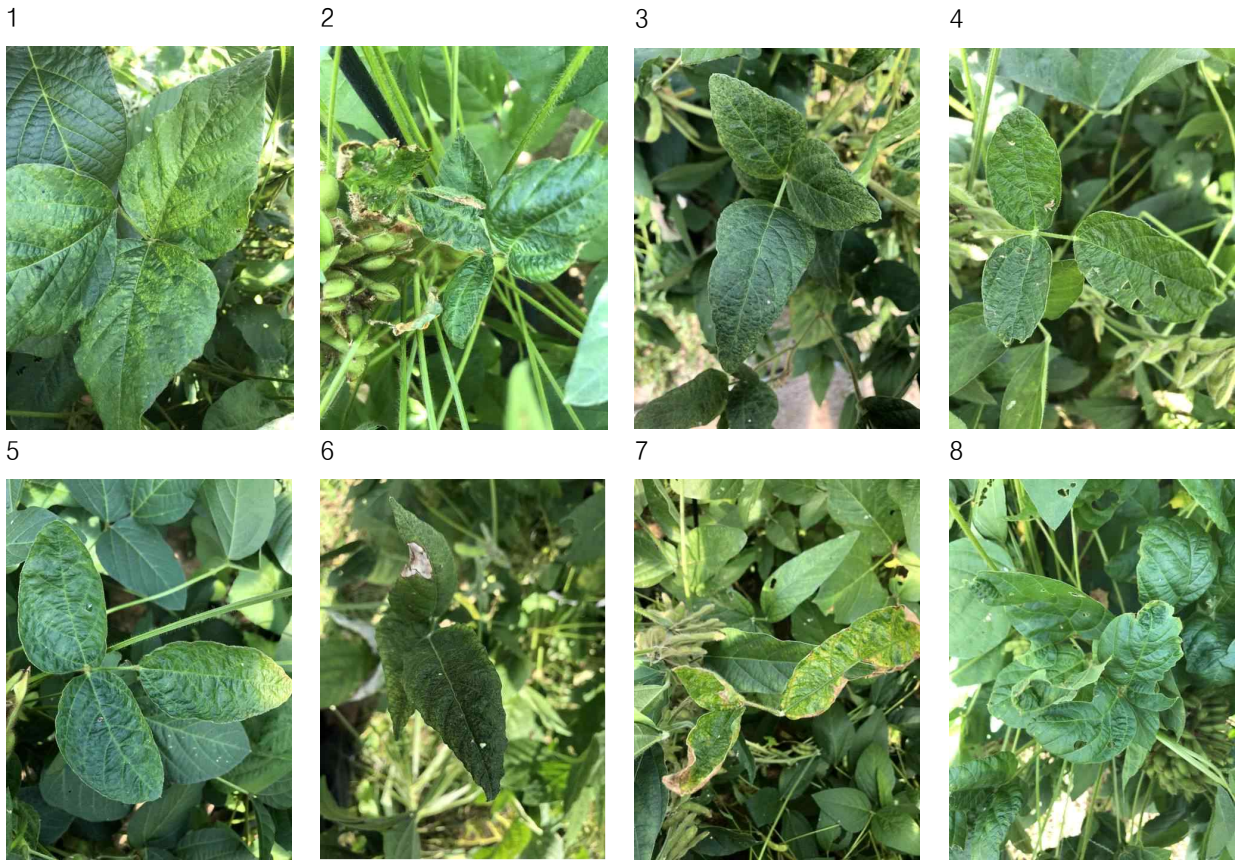


<그림 강-7> 농가포장시료의 기계적 접촉을 통한 실제 바이러스 감염 확인. (1-8) 상기 8개 샘플의 Chenopodium quinoa 에서의 기주 반응



<그림 강-8> 농가포장시료를 대상으로 Real-time LAMP를 이용한 TuMV 진단

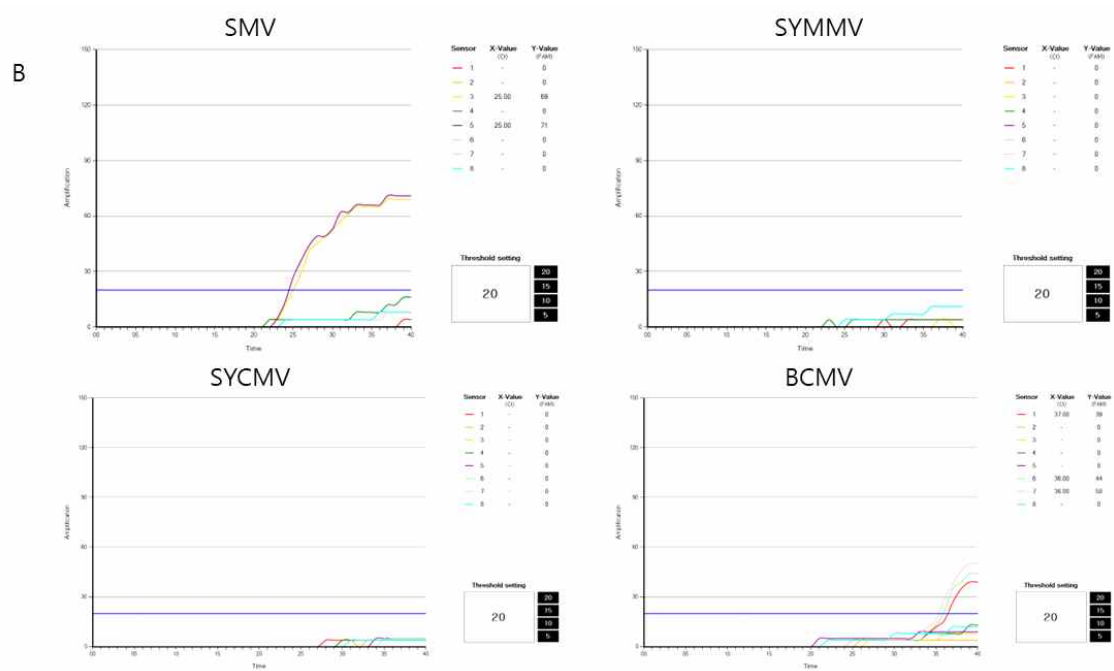
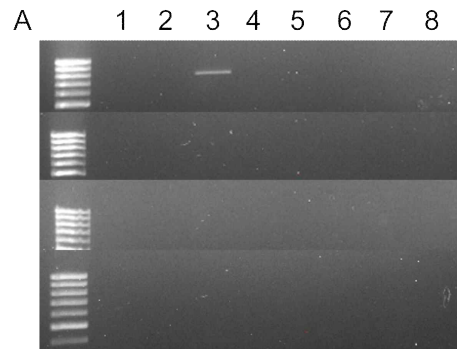
- 채집된 샘플을 대상으로 기존 진단방법인 RT-PCR, Real-time PCR과 새로 개발된 Real-time LAMP 키트를 이용하여 바이러스를 검정하였다.
- 그 결과 민감도 테스트와 마찬가지로 RT-PCR은 8개 샘플 중 7개 샘플에서만 바이러스를 검정한 반면 Real-time PCR과 Real-time LAMP의 경우 8개 샘플 모두에서 TuMV를 검정하였다.
- 또한 강원도 6개 시군에서 채집된 샘플은 주로 TuMV에 의해 감염되며 추가적으로 TYMV가 TuMV와 함께 복합감염되는 형태로 존재한다는 것을 확인하였으며, RMV는 세가지 진단 방법에서 모두 검정되지 않았다.
- 검정된 TuMV의 실제 감염여부 확인을 위해 지표식물인 Chenopodium quinoa에 접종하여 그 반응을 관찰한 결과 검정결과와 일치하게 8개 샘플에서 바이러스 반응을 확인할 수 있었다.
- 이후 강원도내 다른 시군 (양구, 인제, 춘천)의 농가에서 추가 샘플을 채집하여 Real-time LAMP키트를 이용해 TuMV를 손쉽게 진단할 수 있었다.



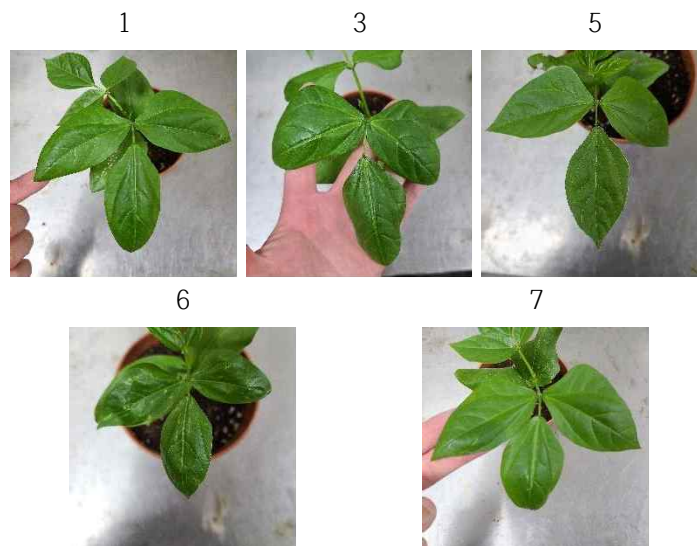
<그림 강-9> 콩 포장에서 발생하는 바이러스병 증상 (1) 모자이크, (2) 기형, 모자이크, (3-4) 모틀, (5) 약한 모자이크, 주름, (6) 기형, 모틀, (7) 기형, 황화, 괴사, (8) 기형

○ 농가포장시료에 대한 진단검사 및 유용성 평가를 위해 바이러스성 병징을 나타내는 다양한 품종의 콩을 채집하였다.

○ 채집된 시료는 병징이 다양하게 존재하였다.



<그림 강-10> 콩 시료를 대상으로 기존 검정방법 (RT-PCR)과 Real-time LAMP를 이용한 비교 진단



<그림 강-10> 콩 시료의 기계적 접촉을 통한 실제 바이러스 감염 확인. (1, 3, 5, 6, 7) 상기 바이러스가 확인된 5개 샘플의 동부에서의 기주 반응

○ 채집된 샘플을 대상으로 total RNA를 추출하여 기존 진단방법인 RT-PCR과 새로 개발된 Real-time LAMP 키트를 이용하여 바이러스를 검정하였다.

○ 그 결과 RT-PCR은 한개 샘플 (3번)에서만 SMV가 검정되었으며, 다른 샘플 및 다른 바이러스는 검정되지 않았다. 반면에, Real-time LAMP kit에서는 3번과 5번 샘플에서 SMV가 검정되었으며, 1번, 6번, 7번의 샘플에서 BCMV를 검출하였다. 또한 Ct값을 통해 BCMV가 낮은 농도에서 존재한다는 것을 확인하였다.

○ 확인된 바이러스가 실제 감염능력을 갖춘 바이러스인지 확인하기 위해 SMV가 검정된 3번, 5번 샘플과 BCMV가 확인된 1번, 6번, 7번 샘플을 동부 콩에 접종하고 그 반응을 확인한 결과, Real-time LAMP로 검정된 샘플에서 바이러스성 병징이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

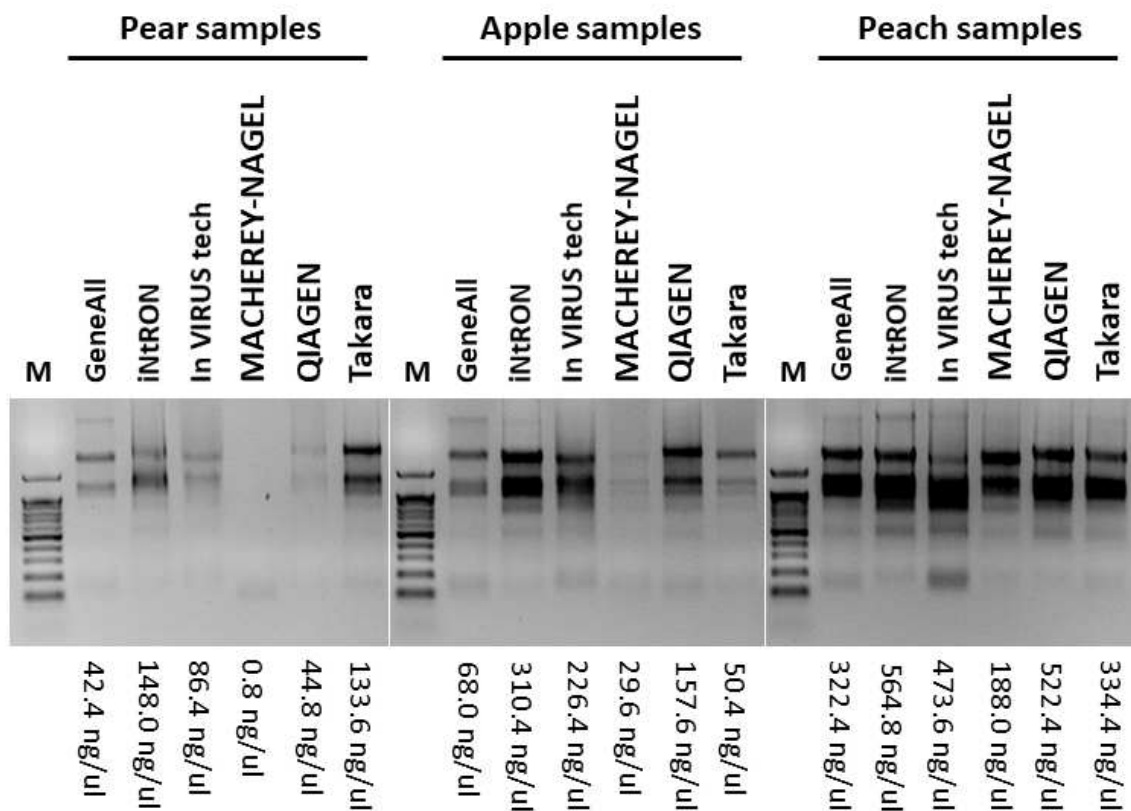
○ 종합적으로 상기 배추와 무, 그리고 콩 샘플의 검정을 통해 Real-time LAMP 키트가 기존 진단 방법인 RT-PCR에 비해 간단한 절차와 짧은 시간 내에 고민감도로 바이러스를 검출할 수 있음을 확인하였다.

■ 위탁연구기관-전남대 추가 연구결과

1. 과수(사과, 배 등)바이러스 감염 식물로부터 진단을 위한 효율적인 핵산 추출 버퍼 확립

○ 국내 유통되고 있는 핵산 추출 kit 비교 분석

- 바이러스 감염된 배, 사과, 복숭아에서 효율적인 진단을 위해 과수에서 최적의 핵산 추출 키트를 찾고자 시중에 판매되고 있는 6개의 total RNA 추출 키트를 비교함 (그림 전-1).
- 비교한 키트 종류는 GeneAII, iNtRON, In VIRUS tech, MACHEREY-NAGEL, QIAGEN, Takara 사에서 판매되고 있는 RNA 추출 키트를 사용함. 추출 과정은 제조사에서 제공되는 설명서에 따라 수행함.
- 배, 사과, 복숭아에서 각 각의 키트를 비교한 결과, 농도와 Quality, 비용 측면에서 최종적으로 In VIRUS tech가 선택되었고 이 후 모든 실험에서 사용함.

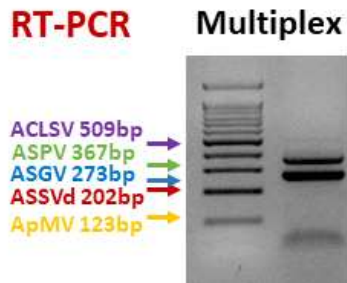


<그림 전-1> 핵산 추출 키트 비교

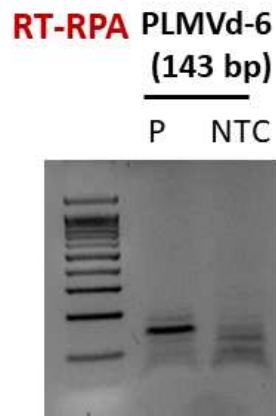
○ Filter paper를 활용한 현장 핵산 추출 방법 확립

- Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 5분 만에 식물 시료에서 핵산을 쉽게 얻을 수 있는 방법을 확립하였고, 이를 통해 얻는 Filter paper-핵산을 사용하여 일반적인 RT-PCR과 현장 진단용 기술인 RT-RPA, RT-RPA-LFS에 적용함(자세한 방법은 별첨 1를 참고).
- 바이러스 감염된 사과 시료에서 핵산을 추출하고 RT-PCR를 수행한 결과, Multiplex RT-PCR임에도 ASPV, ASGV가 복합 감염된 것으로 확인됨(그림 전-2).
- 복숭아 시료에서 핵산을 추출하고 PLMVd를 RT-RPA 방법으로 검출한 결과, Positive sample에서만 증폭됨(그림 전-3).
- TSWV가 감염된 고추시료에서 핵산을 추출하고 현장진단 용 RT-RPA-LFS를 사용한 결과, Positive sample에서만 증폭됨(그림 전-4).
- Whatman No.1 Filter paper 기술을 통해 현장에서 5분 만에 빠르고, 특별한 장비 없이 쉽게 핵산을 확보하는 기술을 확립하였고, RT-PCR과 RT-RPA, 현장진단 용 RT-RPA-LFS에서 적용이

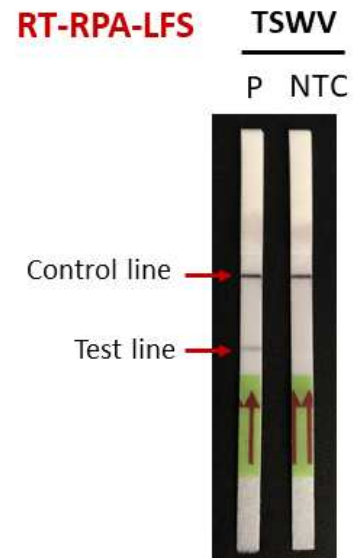
가능하여 현장 진단에 유용하게 활용될 수 있음.



<그림 전-2> RT-PCR



<그림 전-3> RT-RPA



<그림 전-4> RT-RPA-LFS

- Filter paper를 활용한 현장 핵산 추출 및 식물바이러스 검출 실험 수행함. Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 농업 현장에서 5분만에 식물 시료 핵산 추출 및 RT-RPA-LFS를 사용하여 바이러스 진단함 (그림 전-5).

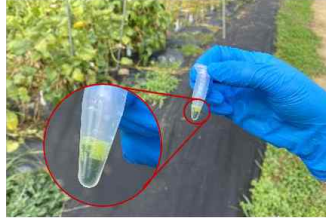
1. 감염조직 채취 및 분쇄



2. 즙액에 paper 첨가



3. 30초간 반응



4. 핵산이 결합된 paper



5. Wash buf에 paper 첨가



6. 30초간 반응



7. 핵산이 결합된 paper를 RPA 혼합물에 첨가



8. RPA 혼합물에 첨가된 paper



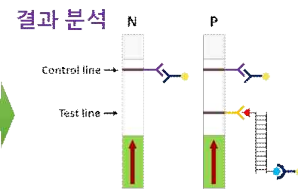
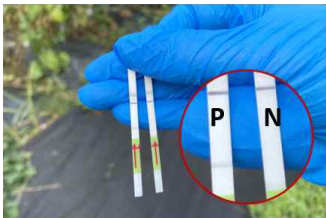
9. 현장등온장치를 이용한 RPA 반응



10. LFS를 사용하여 결과 확인



11. 바이러스 검출

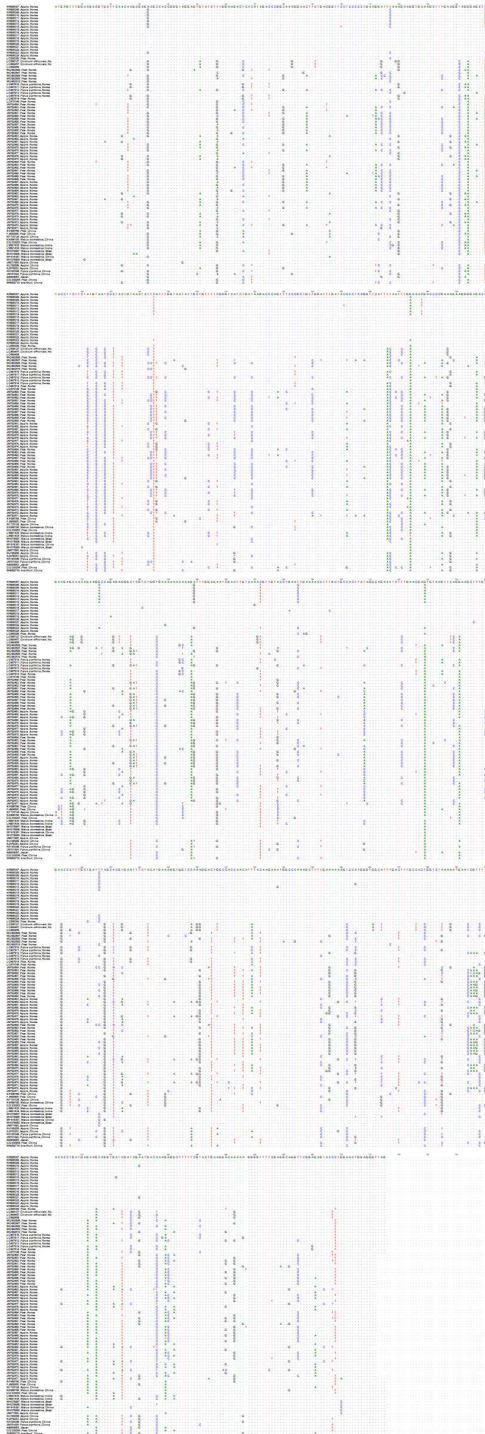


<그림 전-5> 추출버퍼를 활용한 RPA 이용 식물바이러스 현장 검출

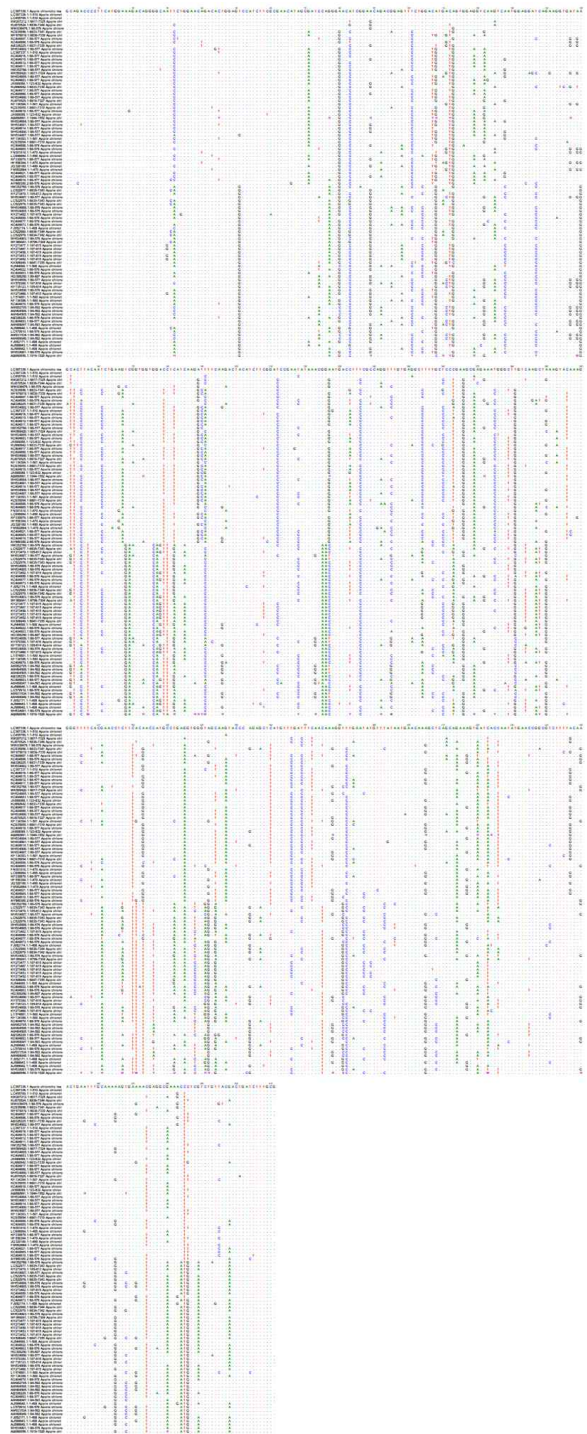
2. 과수(사과, 배 등) 주요 바이러스 국내외 분리주 염기서열 확보 및 분석

○ 과수 주요 바이러스를 진단하기 위한 프라이머를 제작하기 위해 국내외 염기서열 확보

- 배와 사과에서 문제가 되는 ASGV, ACLSV의 현장 진단 용 프라이머 및 프로브를 제작하기 위해 NCBI genbank에서 국내외 분리주를 90-100개 확보하였고, bioedit sequence alignment editor program를 사용하여 sequence alignment하여 보존된 영역을 확인함(그림 전-6, 전-7).



<그림 전-6> ASGV 염기서열 alignmnet

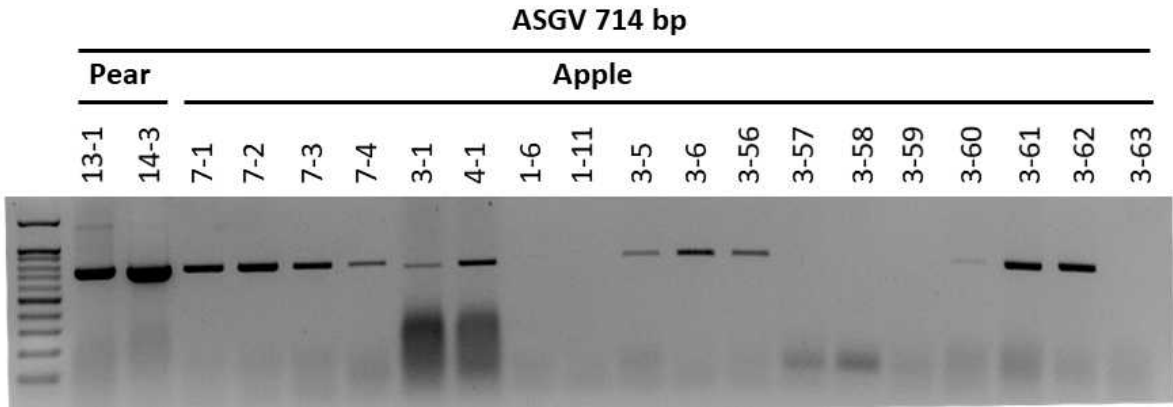
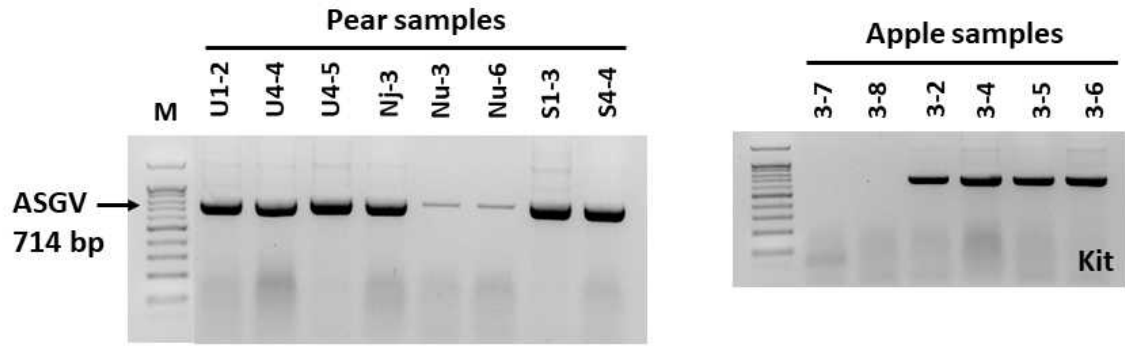


<그림 전-7> ACLSV 염기서열 alignmnet

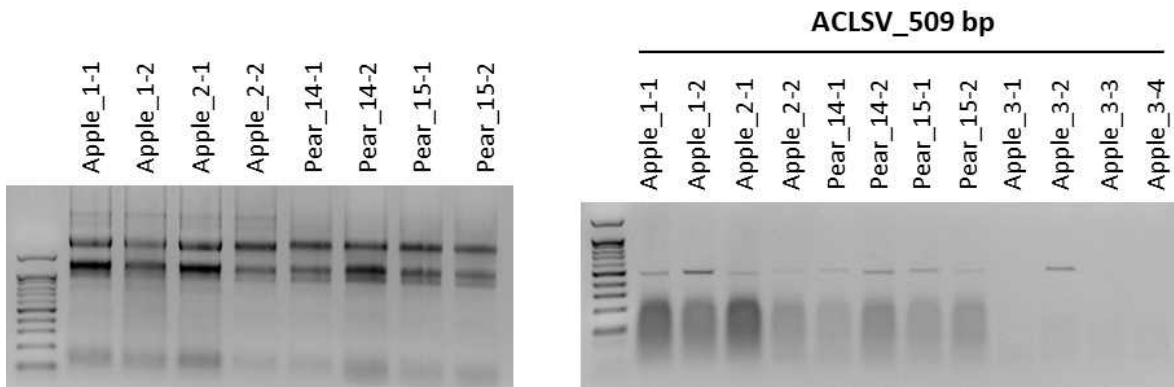
3. 과수(사과, 배 등) 주요 바이러스 시료 확보

○ 과수 주요 바이러스를 진단하기 위한 바이러스 감염 시료 확보

- 배와 사과 시료에서 total RNA를 추출하고, ASGV, ACLSV 진단 프라이머를 사용하여 RT-PCR를 수행함.
- ASGV-714 bp 진단 프라이머와 ACLSV-509 bp 진단 프라이머를 통해 ASGV의 경우 26개의 감염시료와 8개의 비감염 시료를 확보하였고(그림 전-8), ACLSV의 경우 9개의 감염시료와 3개의 비감염 시료를 확보함(그림 전-9).



<그림 전-8> ASGV 감염 시료 확보



<그림 전-9> ACLSV 감염 시료 확보

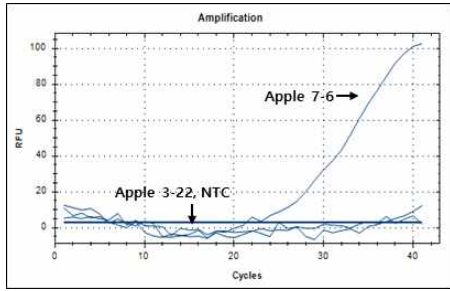
4. 과수(사과, 배 등)바이러스 신속진단을 위한 RT-RPA 조건 확립

- 엘씨엠싸이언스회사에서 제작한 Primer로 RT-RPA 실험을 진행함.

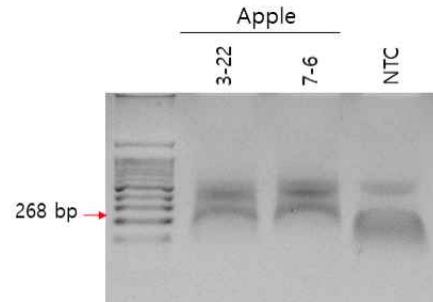
표 전-1. ACLSV에 대한 exo RPA 프라이머 및 프로브 서열

프라이머 프로브 이름	염기서열 5'-3'	중폭 크기(bp)
3775F	ATGAATGACTTTATTGGCATAGATGAACAA	
ACLSV 4042R	TTCTAAATCTTGTTATTGCCACCATTATGT	286
3849P	AAGAAAGGGAATCACATAGAAGTAATTCTTGTTG	

- ACLSV 특이적 프라이머 및 프로브셋을 사용하여 exo RPA를 통해 증폭여부를 실험함. exo RT-RPA 반응은 Twist Exo kit (TwistDX) 제품을 사용하여 제품의 protocol을 따라 수행되었음. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음(그림 전-10).
- ☞ ACLSV 감염이 확인된 사과 시료와 NTC를 조건으로 exo RPA를 수행한 이후, 전기영동을 통해 gel을 확인해본 결과, P.C에서는 증폭산물로 보이는 Band가 확인되었지만, NTC조건에선 확인되지 않음(그림 전-11).

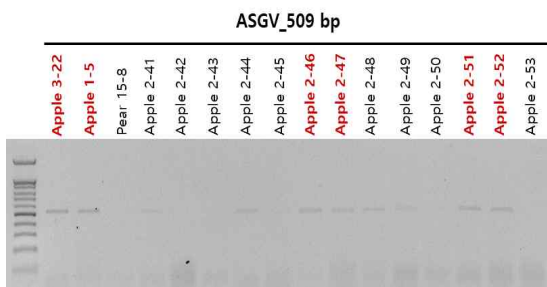


<그림 전-10> ACLSV exo RPA

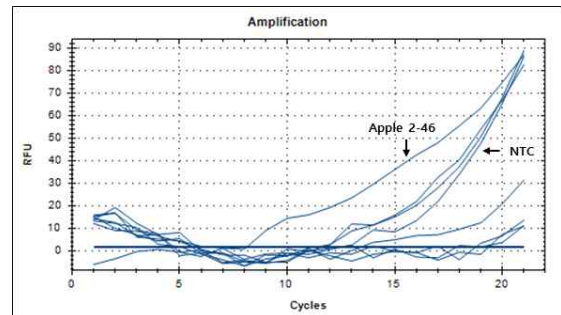


<그림 전-11> ACLSV exo RPA product 전기영동

- 사과시료에서 ACLSV-509 bp 진단 프라이머를 통해 ACLSV 감염시료를 추가로 확보함(그림 12).
- ACLSV 감염이 확인된 6개 시료(Apple 3-22, Apple 1-5, Apple 2-46, Apple 2-47, Apple 2-51, Apple 2-52)를 추가로 포함하여 exo RPA를 진행하였음. Incubation 조건은 39 °C에서 1 분간 20 cycle로 진행하였음(그림 전-13).
- ☞ 감염시료에서 증폭이 확인되지 않음. NTC조건에서 비특이적인 증폭이 확인됨.



<그림 전-12> ACLSV 감염시료 확보



<그림 전-13> ACLSV exo RPA

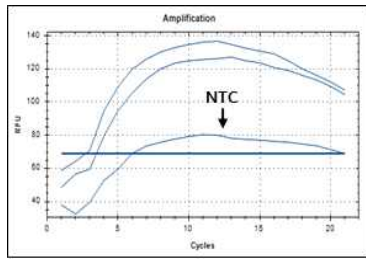
표 전-2. ASGV에 대한 exo RPA 프라이머 및 프로브 서열

프라이머 프로브 이름	염기서열 5'-3'	증폭 크기(bp)
ASGV1	258F CCAATATCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTTGTA 465R CACCATACCTATATTTATCTTTCCCATCAATTATG 351P GAAAATAAAGTTAATAGTTTTCTCAAGATGCATTC	208
ASGV2	264F TCCAAAATGATAGAAAATCATCTTTGTACATATG 387R TATCCAAGTCTTCTATCTTCTTTAAGTCAGTT 299P CTGAATGCATCTTGAGAAAACATTAACTTTATTT	124

	5610F	TCTCAGCTAGAATTGAAAGATTTGGAAAAA	
ASGV3	6007R	GACAAGTCGATTCTCCAAATTTTTGTTTTT	398
	5825P	ATTTGGTAATATTGCTGTTTTTCGGGTCATCTGATA	

- ASGV가 단독감염된 배시료와 ASGV, ACLSV가 복합감염된 사과시료를 3가지의 ASGV 특이적 프라이머 및 프로브셋을 사용하여 각각 exo RPA를 통해 증폭여부를 실험함. Incubation 조건은 39 °C에서 1 분간 20 cycle로 진행하였음.

☞ 3 개의 프라이머로 실험을 진행한 각각의 감염시료와 NTC조건 모두에서 증폭이 확인되지 않음(그림 전-14, 그림 전-15, 그림 전-16).

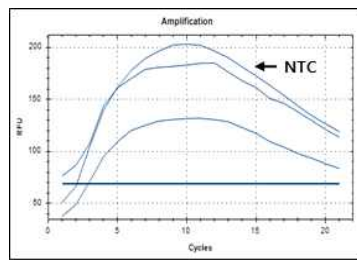


ASGV1 (208 bp)

Apple_7-6
Pear_13-11
NTC



<그림 전-14> ASGV
프라이머1 exo RPA

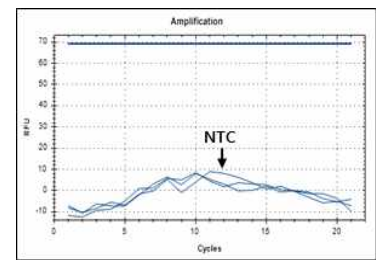


ASGV2 (124 bp)

Apple_7-6
Pear_13-11
NTC

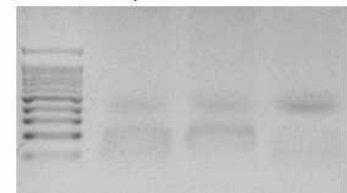


<그림 전-15> ASGV
프라이머2 exo RPA



ASGV3 (398 bp)

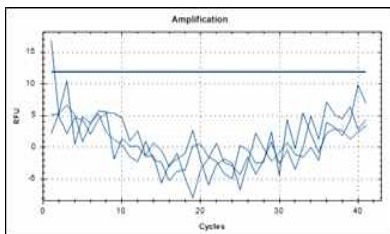
Apple_7-6
Pear_13-11
NTC



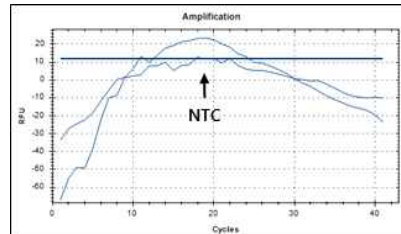
<그림 전-16> ASGV
프라이머3 exo RPA

- ASGV 프라이머 중 정상적인 증폭곡선이 아닌 프라이머3을 제외한 ASGV 프라이머1과 프라이머2, ACLSV 프라이머를 ASGV와 ACLSV가 복합감염된 사과시료를 사용하여 exo RPA를 진행함. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음.

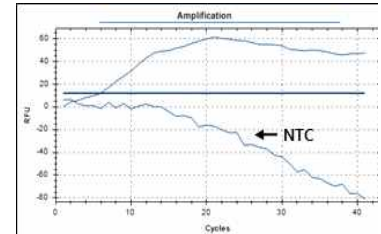
☞ 모든 조건의 시료에서 증폭이 확인되지 않음 (그림 전-17, 전-18, 전-19).



<그림 전-17> ACLSV 프라이머
exo RPA



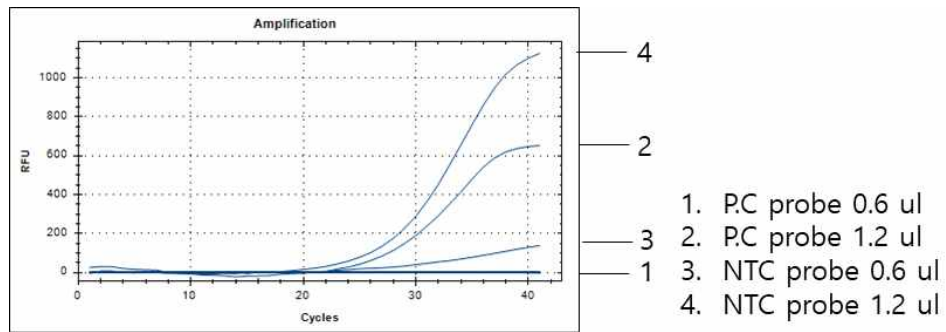
<그림 전-18> ASGV 프라이머1
exo RPA



<그림 전-19> ASGV
프라이머2 exo RPA

- 이전의 실험들과 달리 시약조성에서 프로브 농도에 차이를 주어 시료를 비교하기 위해 ACLSV 감염시료와 ACLSV 프라이머 및 프로브를 사용하여 exo RPA를 수행함. Incubation 조건은 39 °C에서 30 초간 40 cycle로 진행하였음.

☞ 제대로 된 증폭이 확인되지 않음. NTC조건에서도 비 특이적인 증폭이 확인됨(그림 전-20).



<그림 전-20> ACLSV 감염시료 프로브 농도별 exo RPA

5. 과수(복숭아, 사과 등) 주요 바이러스의 RT-RPA 진단 시스템 개발

- 과수(복숭아, 사과 등)의 주요 바이러스를 진단하기 위한 바이러스 감염 시료 확보
 - 국내 과수(복숭아, 사과 등) 농가에서 바이러스 병징이 관찰된 과수의 잎 시료를 채집하였고, 해당 시료를 바이러스 RPA 진단 실험에 사용하였음 (그림 전-21, 전-22).



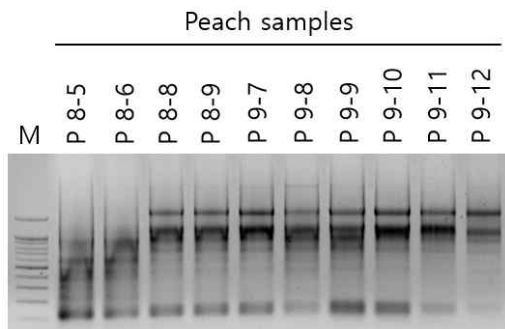
<그림 전-21> 바이러스 감염 복숭아 시료 채집



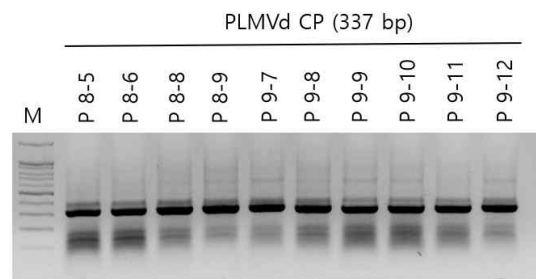
<그림 전-22> 바이러스 감염 사과 시료 채집

○ End-point RPA 방법을 이용한 복숭아 시료 PLMVd 신속 현장 진단법 개발 및 시험

- 복숭아 시료의 Total RNA 추출은 In VIRUS tech사에서 판매되고 있는 total RNA 추출 키트를 사용하였으며 추출 과정은 제조사에서 제공되는 설명서에 따라 수행하였고 전기영동을 통해 Total RNA를 확인하였음(그림 전-23).
- Whatman No.1 Filter paper 기술을 통해 현장에서 5분 만에 빠르고, 특별한 장비 없이 쉽게 핵산을 확보하는 기술을 확립하였고, RT-RPA 방법에 사용하여 바이러스를 진단함.
- 확보한 복숭아 시료에서 Total RNA를 추출하고 PLMVd 진단 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행함.
- PLMVd-337 bp 진단 프라이머를 통해 10개의 PLMVd 감염 시료를 확보함(그림 전-24).

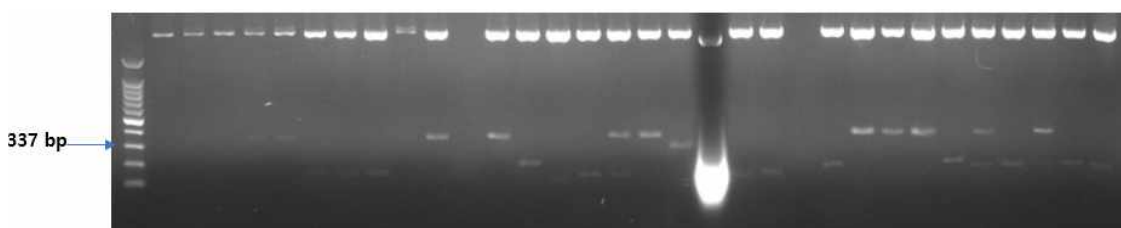


<그림 전-23> 복숭아 시료 Total RNA



<그림 전-24> PLMVd 감염 시료 확보

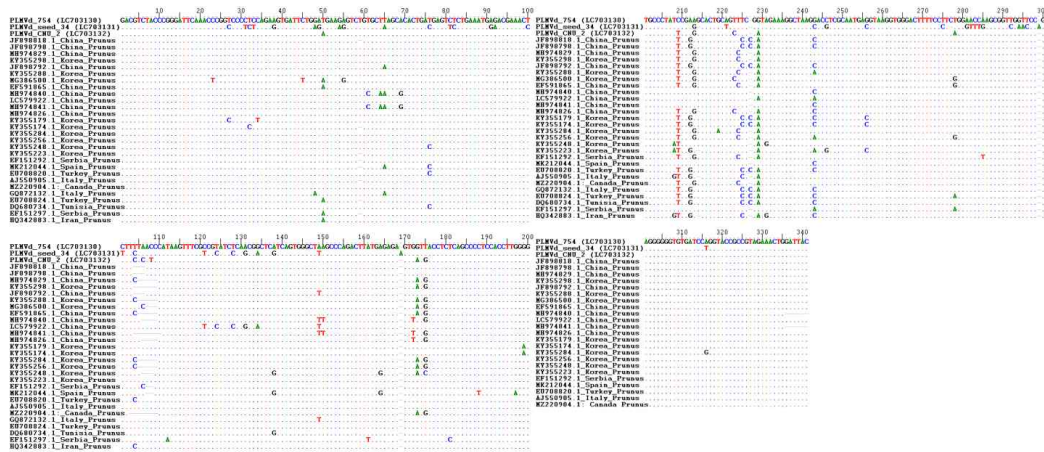
- 복숭아 시료에서 증폭된 PLMVd의 염기서열을 확보하기 위해 TA cloning 실험을 하였음. 과정은 아래와 같음.
- ◆ RT-PCR을 통한 증폭 산물에 AccuPrep PCR/Gel Purification Kit (Bioneer)을 사용하여 DNA purification을 수행함.
- ◆ TA cloning kit(Yeastern Biotech)를 이용하여 상기의 clean-up한 DNA의 ligation을 수행함. PCR product 3 μ l, T&A cloning vector 2 μ l, ligation buffer A, B 각각 1 μ l, DEPC water 3 μ l를 넣고 4°C, 16h 반응시킴.
- ◆ Transformation을 수행하기 위해 DH5 α competent cells 100 μ l와 ligation 혼합액을 넣고 ice에서 30분간 반응시킨 후 42°C에서 1분간 열쇼크(heat shock)를 주고 5분간 ice상에서 식힌 후 LB broth 배지 900 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 동안 160 rpm으로 진탕배양함. 그리고 50 μ g ampicillin 첨가한 LB agar 배지에 100 μ l 도말하여 37°C에서 16시간 배양함.
- ◆ 50 μ g ampicillin 첨가한 LB broth 배지 3 ml에 여러개의 colony를 접종하여 16시간 진탕배양함. 대량 배양된 cell은 12,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 배지를 제거한 후에 Alkaline lysis miniprep 방법을 이용하여 plasmid DNA를 추출하고 restriction enzyme를 처리하여 337 bp의 insert가 확인된 plasmid DNA의 염기서열을 분석함 (그림 전-25).



<그림 전-25> restriction enzyme를 처리한 PLMVd plasmid 전기영동

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Peach latent mosaic viroid PLMVd_754 RNA	Peach latent m...	544	544	86%	5e-150	100.00%	294	LC703130.1
Peach latent mosaic viroid PLMVd_CU_2 RNA	Peach latent m...	483	483	86%	1e-131	96.26%	294	LC703132.1
Peach latent mosaic viroid isolate PQ813 genomic sequence	Peach latent m...	470	470	79%	8e-128	98.14%	269	MT083908.1
Peach latent mosaic viroid isolate PQ854 genomic sequence	Peach latent m...	442	442	79%	2e-119	96.28%	269	MT083906.1
Peach latent mosaic viroid isolate PQ804 genomic sequence	Peach latent m...	436	436	79%	8e-118	95.91%	269	MT083907.1
Peach latent mosaic viroid isolate P-Vioyl_complete sequence	Peach latent m...	422	620	100%	2e-113	99.57%	338	MW928680.1
Peach latent mosaic viroid isolate P-WB258_complete sequence	Peach latent m...	414	613	100%	4e-111	99.13%	337	MW928681.1
Peach latent mosaic viroid isolate y4-pg3_complete genome	Peach latent m...	399	591	99%	1e-106	97.84%	336	MK212063.1
Peach latent mosaic viroid isolate PL1_complete genome	Peach latent m...	399	587	99%	1e-106	97.84%	337	EF151292.1

<그림 전-26> PLMVd 바이로이드 sequence NCBI BLAST 검색



<그림 전-27> PLMVd 바이로이드 sequence alignmnet

- 분석한 PLMVd의 sequence는 bioedit alignment editor program을 사용하여 sequence alignment 되었으며 이를 통해 보존된 영역을 확인함 (그림 전-26, 전-27).
- 기존 사용 프라이머 143bp 이외에도 RPA kit 제조사인 TwistDX사의 프라이머 design manual에 따라 30-35 nt, 100~200bp amplicon length의 프라이머 4종류를 제작하여 3가지의 조합을 설정하였음.

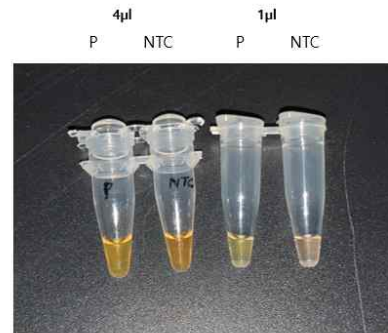
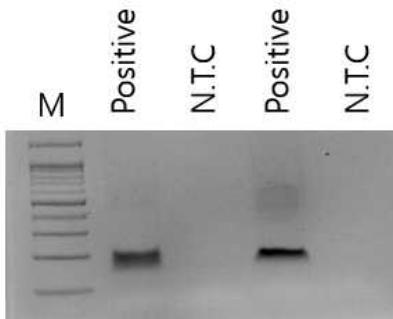
표 . PLMVd에 대한 RPA 프라이머 서열

Primer	Sequence 5'-3'
PLMVd 143 F	CATCTCAGCGACTCATCAGTGGGCTTTGCC
143 R	CCCACCTTACGTCATTGCGACGTGCTTAGCC
7706 F	CTCTCAGCCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTA
2697 R	CTACGGCGGTACCTGGATCACACCCCCCTC
3968 F	TCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA
7243 R	GGAAAAGTCCCACCTTACCTCATTGCGAGG

표 전-3. 프라이머 조합에 따른 증폭 크기

Primer sets		Product size (bp)
PLMVd	143 F + 143 R	143
	7706 F + 2697 R	150
	3968 F + 7243 R	134
	7706 F + 7243 R	188

- 핵산 추출 kit를 사용해 total RNA를 추출 후 RT-RPA를 통해 증폭 여부를 실험함. RT-RPA 반응은 TwistAmp Basic kit 제품을 사용하여 제품의 protocol을 따라 수행되었음. PLMVd 특이적 프라이머는 143 F와 143 R를 사용하였으며 Incubation 조건은 42°C에서 30분간 진행하였음.
- RT-RPA 반응 이후 400x SYBR Green I을 RPA product에 넣고 녹색의 형광을 확인하여 증폭 여부를 확인하여 현장에서 신속하게 진단하고자 하였음.
- PLMVd 감염이 확인된 사과 시료와 NTC를 조건으로 RT-RPA를 수행한 이후, 전기영동을 통해 gel을 확인해본 결과, P.C에서는 증폭 산물로 보이는 Band가 확인되었지만, NTC 조건에선 확인되지 않음(그림 전-28).
- RPA product에 400x SYBR Green I을 첨가하여 녹색의 형광을 확인하였으며 증폭이 일어나지 않은 NTC 조건에서는 SYBR Green I의 형광이 나타나지 않은 황색을 확인하였음(그림 전-29).



<그림 전-28> PLMVd RPA product 전기영동 <그림 전-29> PLMVd RPA product + SYBR Green I

- SYBR Green I의 반응 이후 녹색 형광과 황색의 차이가 크지 않아 SYBR Green I의 농도를 조절하고 형광의 발현 효과를 확대하여 증폭 여부를 뚜렷하게 구분하고자 하였으나 동일한 조건으로 재실험한 결과의 NTC 조건에서 지속해서 비특이적 증폭이 확인되어 정확한 검증을 할 수 없었음(그림 전-30).



P NTC

• SYBR Green I : 100x

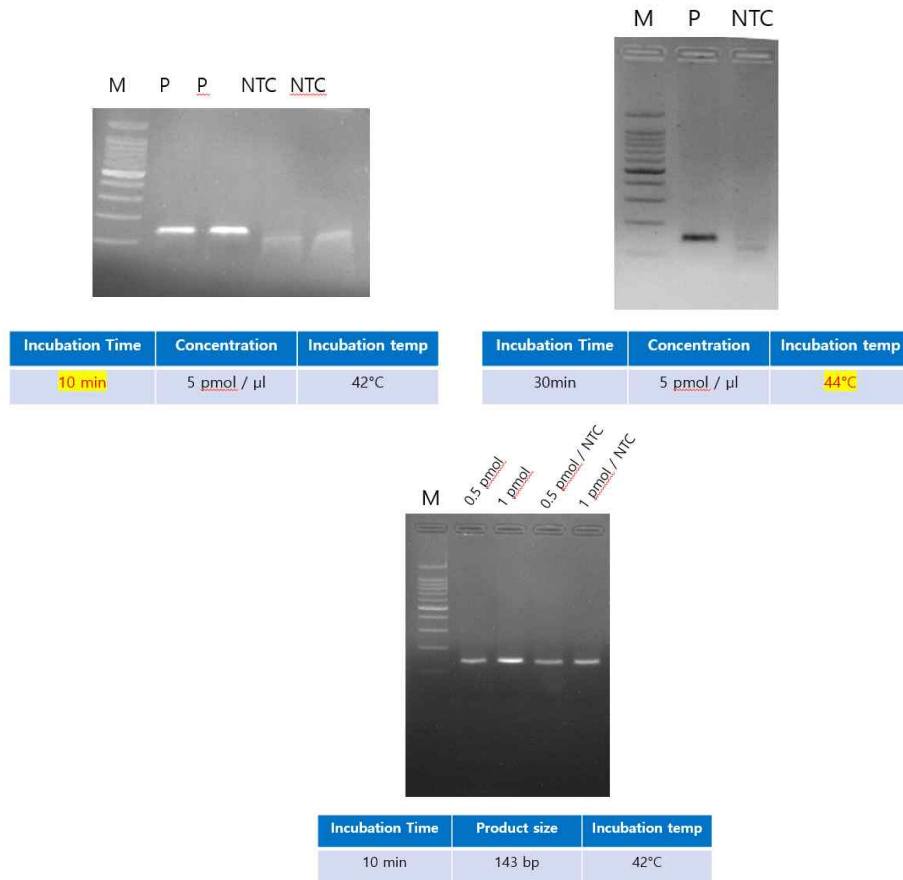


P NTC

• SYBR Green I : 200x

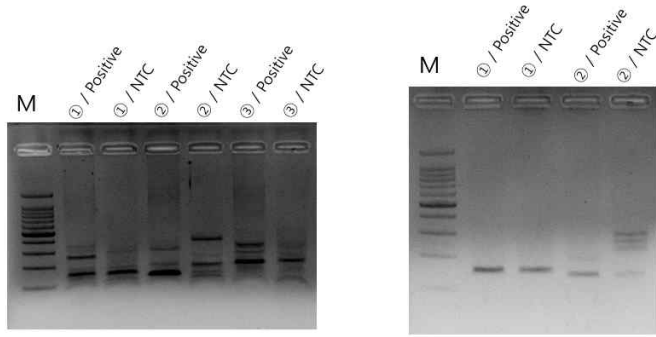
<그림 전-30> SYBR Green I 농도 조절

- NTC 조건의 비특이적 증폭을 없애거나 최소화하기 위하여 프라이머의 농도, incubation 시간, incubation 온도 등을 조절하였지만 비특이적 증폭이 지속해서 나타나 SYBR Green I의 효과를 비교할 수 없었음(그림 전-31).



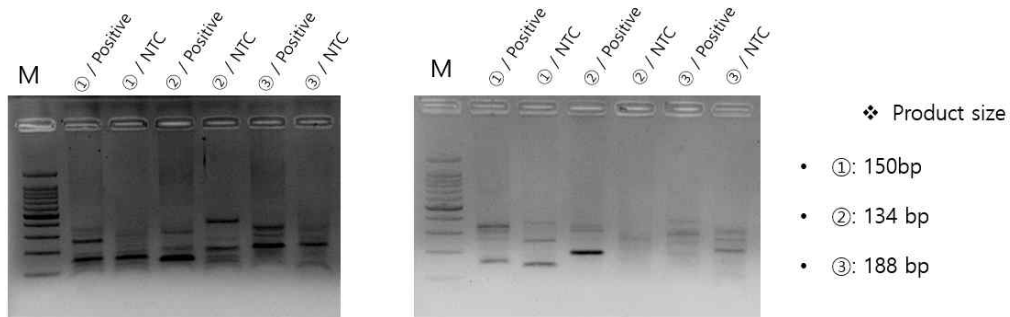
<그림 전-31> RT-RPA 조건 변경

- NTC 조건에서 비특이적 증폭이 확인되는 PLMvd 143 bp 프라이머 이외에 sequence alignment를 통해 제작한 3가지 조합의 프라이머를 이용하여 추가로 조건을 최적화하고자 하였음.
- NTC 조건에서 비특이적 반응이 확인되어 incubation 시간, incubation 온도 등을 변경하여 진행하였지만, 비특이적 반응이 지속해서 확인됨(그림 전-32, 전-33).



Incubation Time	Temp	Concentration	Incubation Time	Temp	Concentration
30 min	42°C	5 pmol / μ L	10 min	42°C	5 pmol / μ L

<그림 전-32> Incubation 시간 변경

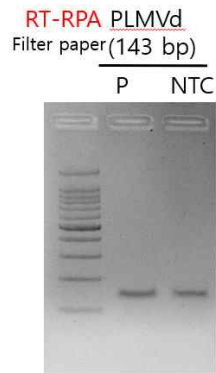


Incubation Time	Temp	Concentration	Incubation Time	Temp	Concentration
30 min	42°C	5 pmol / μ L	30 min	45°C	5 pmol / μ L

<그림 전-33> Incubation 온도 변경

6. Filter paper를 활용한 RT-RPA 진단법 시험

- 현장에서 빠르게 PLMVd 감염을 진단하기 위해 Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 5분 만에 식물 시료에서 핵산을 쉽게 얻는 방법을 확립하였고, 이를 통해 얻는 Filter paper-핵산을 사용하여 일반적인 RT-PCR과 현장 진단용 기술인 RT-RPA에 이용할 수 있음.
- Filter paper를 이용해 빠르게 핵산을 추출하고 RT-RPA 방법에 이용하였고 전기영동을 하거나 SYBR Green I을 첨가하여 형광물질의 발현으로 증폭 여부를 확인함.
- Positive sample, Negative sample 모두 증폭이 확인되었음.
- 전기영동을 통해 특정 band의 증폭을 확인하였으나 NTC 조건에서도 증폭이 확인되었음 (그림 전-34).
- SYBR Green I를 이용한 증폭 여부의 확인 또한 NTC 조건에서 녹색의 형광이 확인 (그림 전-35).
- Filter paper를 이용한 핵산 추출은 정상적으로 이루어졌으며 RT-RPA 방법에 이용할 수 있다는 것을 확인했지만 NTC의 비특이적 증폭을 없애거나 최소화하기 위해 프라이머의 재설정이나 각 조건들의 변경이 필요해보임.
- 또한 Filter paper를 이용한 핵산 추출 과정에서 녹색의 식물 즙액에 의해 SYBR Green I을 넣지 않아도 녹색이 나타남(그림 전-36).



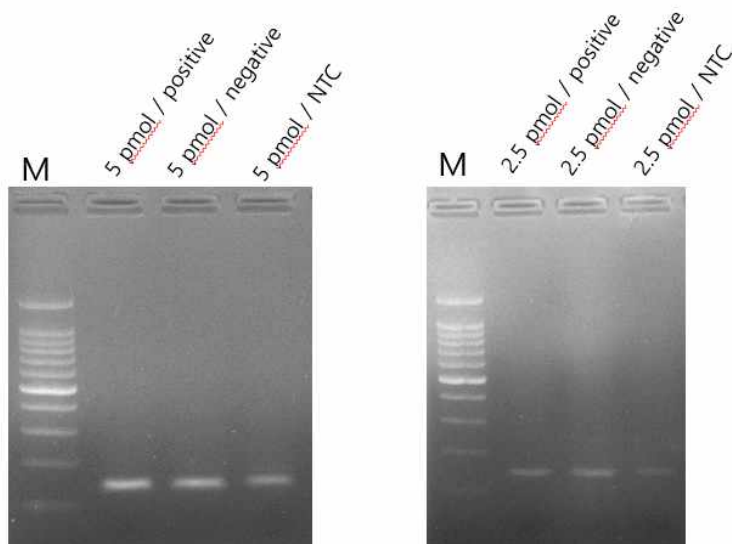
<그림 전-34> Filter paper를 이용한 RT-RPA

<그림 전-35> SYBR Green I을 이용한 육안 검출



<그림 전-36> Filter paper를 이용한 RT-RPA 과정에서 색

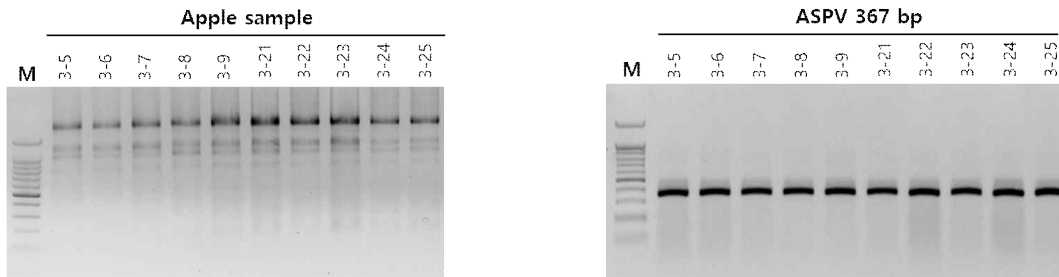
- 기존 P.C와 NTC 조건에 Negative Control을 추가하여 증폭 여부를 전기영동으로 확인하였으나 N.C 또한 비특이적 증폭이 확인되었음(그림 전-37).



<그림 전-37> Filter Paper를 이용한 RT-RPA (N.C 포함)

○ 사과 시료 바이러스 염기서열 확보를 위한 TA cloning

- 바이러스 병징을 보이는 사과 시료는 In VIRUS tech사에서 판매되고 있는 total RNA 추출 키트를 사용하였으며, 제조사에서 제공되는 설명서에 따라 total RNA를 추출하고, ASPV 진단 프라이머 (367 bp)를 사용하여 RT-PCR을 수행함 (그림 전-38).



<그림 전-38> ASPV 감염 사과 시료 확보

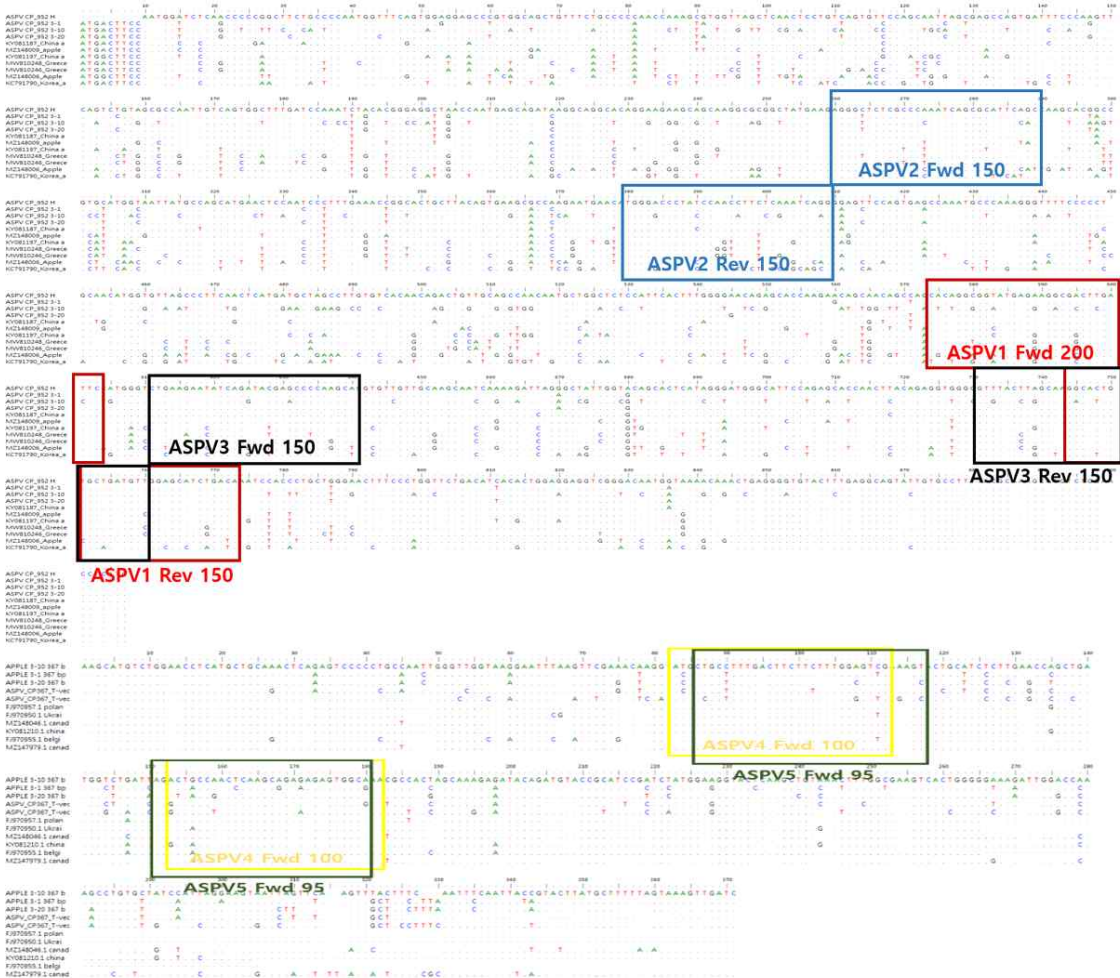
- 사과 시료에서 증폭된 ASPV의 염기서열을 확보하기 위해 TA cloning 실험을 하였음.
- **RT-PCR** : RT-PCR 과정은 SuprimeScript RT-PCR Premix (2x) (Genetbio) 10 μ L, RNA 2 μ L, Primer F, R (10 pmol) 각각 1 μ L, DEPC-treated water 6 μ L로 총 20 total reaction volume으로 수행함. PCR 변온 조건은 Reverse transcription 50 $^{\circ}$ C, 30 min, pre-denaturation 95 $^{\circ}$ C, 5 min 진행 후, denaturation 95 $^{\circ}$ C, 30 min, annealing 30 sec, extension 72 $^{\circ}$ C, 60 sec로 35 cycle진행한 후, 다음 final extension 72 $^{\circ}$ C, 5 min로 수행함.
- **Purification** : 전기영동을 통해 확인한 PCR 산물에 동량의 PCI를 분주하고 10분간 원심분리(12,000 rpm)하여 생성된 상층액을 새로운 1.5 mL tube에 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 가하여 10분간 원심분리함. pellet을 제외한 상층액을 버리고 70% ethyl alcohol (+DEPC)로 2분간 원심분리하여 washing하고 상층액을 제거한 후, DEPC-treated water로 elution함.
- **Ligation** : TA cloning kit(Yeastern Biotech)를 이용하여 DNA와 TA vector의 ligation을 수행함. DNA 2 μ L, TA vector 3 μ L, ligation buffer A, B 각각 1 μ L, DEPC water 3 μ L를 넣고 실온에서 5-10분 incubation 후 4 $^{\circ}$ C, 16h 반응시킴.
- **Transformation** : Transformation을 수행하기 위해 DH5 α competent cells 100 μ L와 ligation 혼합액을 넣고 ice에서 30분간 반응시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 1분간 열쇼크(heat shock)를 주고 5분간 ice상에서 식힌 후 LB broth 1 mL를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 160 rpm으로 진탕배양함. 그리고 ampicillin을 50 μ g/mL 농도로 첨가된 LB agar 배지에 100 μ L 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 배양함.
- Transformation과정에서 LB agar 배지에 생성된 colony를 50 μ g의 ampicillin이 첨가된 LB broth 3 mL에 접종하여 16시간 진탕배양함. 대량 증식된 E.coli cell은 1분간 원심분리하여 액체 배지를 제거한 후에 AccuPrep NanoPlus Plasmid mini Extraction kit (Bio-Neer)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하고 restriction enzyme 처리를 통해 insert가 확인된 plasmid DNA의 염기서열을 분석함.

○ 사과 바이러스의 CP 유전자 분석 및 Alignment

- 사과 잎 시료에서 추출한 RNA에서 검출된 ASPV CP 유전자 염기서열을 분석한 결과, NCBI에 등록된 다른 isolate들의 CP 유전자와 최대 94%의 높은 identity를 나타냄(그림 전-39).
- 염기서열이 확인된 ASPV CP 유전자를 RPA 진단 실험을 위한 프라이머 제작 재료로서 사용하기 위해 ASPV 국내외 분리주들과 Alignment한 후, 보존된 영역을 토대로 프라이머를 제작하였음(그림 전-40).

Apple stem pitting virus isolate FS05-3-3 coat protein gene, complete cds	Apple stem p...	1419	1419	100%	0.0	94.92%
Apple stem pitting virus isolate 13TF155C, complete genome	Apple stem p...	1242	1242	100%	0.0	91.39%
Apple stem pitting virus isolate 13TF174E, complete genome	Apple stem p...	1230	1230	100%	0.0	91.17%
Apple stem pitting virus isolate AGK69 coat protein (CP) gene, complete cds	Apple stem p...	1092	1092	100%	0.0	88.42%
Apple stem pitting virus isolate FS06-4-2 coat protein gene, complete cds	Apple stem p...	1053	1053	100%	0.0	87.64%
Apple stem pitting virus isolate FS07-3 coat protein gene, complete cds	Apple stem p...	1048	1048	100%	0.0	87.53%
Apple stem pitting virus isolate FS07-2-2 coat protein gene, complete cds	Apple stem p...	1048	1048	100%	0.0	87.53%
Apple stem pitting virus isolate FS07-2-1 coat protein gene, complete cds	Apple stem p...	1048	1048	100%	0.0	87.53%

<그림 전-39> ASPV CP 염기서열 분석 결과



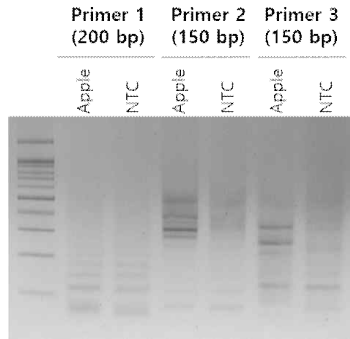
<그림 전-40> ASPV 국내외 분리주 alignment

표 전-4. ASPV에 대한 RPA 프라이머 서열

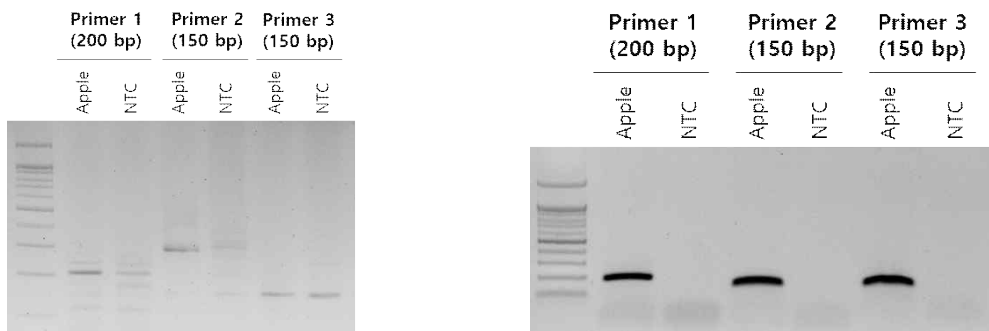
	프라이머	염기서열 5'~3'	증폭 크기(bp)
ASPV1	F	CACAGGCGGTATGAGAAGCGACTTGATTC	200
	R	TGTCAGATGCTCCAACATCAGCACAGTGCC	
ASPV2	F	AGGGCTCTCGCCCAAATCAGCGCATTGAGC	150
	R	CCTGATTTGAGAAGGTTGGATAGGGTCCCA	
ASPV3	F	CTGAAGAATATCAGATACGAGCCCCAAGCA	150
	R	AACATCAGCACAGTGCCTTGCTAAGTAAAC	
ASPV4	F	CTGCTTTTGACTTCTTCTTTGGAGTCGAAA	100
	R	TGCCACTCTCTGTGCTTGAGTTGGTAGTCT	
ASPV5	F	ATGCTGCTTTTGACTTCTTCTTTGGAGTCG	95
	R	TTTGCCACTCTCTCTGCTTGAGTTGGTAGT	

○ 사과 바이러스 신속진단을 위한 RT-RPA 조건 확립

- RT-PCR 상에서 ASPV의 감염이 확인된 사과 시료와 해당 염기서열로 제작한 ASPV 특이적 RPA 프라이머를 사용하여 RT-RPA를 통해 증폭 여부를 실험함. RT-RPA반응은 Twist kit (TwistDX) 제품을 사용하여 제품의 protocol을 따라 수행되었음. Incubation 조건은 42 °C 에서 30분간 진행하였음.
- ASPV 감염이 확인된 사과 시료와 NTC를 조건으로 각 프라이머 별로 10 pmol의 프라이머로 RPA를 수행하고 전기영동을 통해 1.2 % agarose gel을 확인해본 결과, 기대 size의 증폭 band가 확인되지 않았음. (그림 전-41)
- 프라이머 농도 조건을 확립하기 위해 5 pmol로 농도를 낮추어 RPA를 수행하였음. 그 결과 프라이머 1번과 3번에서 기대 size의 증폭 band가 확인되었으나 NTC 조건에서 또한 증폭 band가 확인됨. 같은 조건으로 프라이머의 정상적인 증폭 여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 진행한 결과, 사과 시료에서는 정상적인 증폭이 확인되었고 NTC 조건에서는 증폭이 확인되지 않았음. RT-PCR 결과로 미루어 보아 제작한 RPA 프라이머에는 문제가 없다고 판단됨(그림 전-42, 전-43).
- RPA 프라이머가 사과 시료에서 비특이적인 증폭은 보이는 것으로 판단되어 ASPV transcript를 주형으로 사용하여 RPA 실험을 진행하였음. 그 결과, ASPV transcript를 사용한 조건과 NTC 조건 모두에서 정상적인 증폭을 보이지 않았음(그림 전-44).

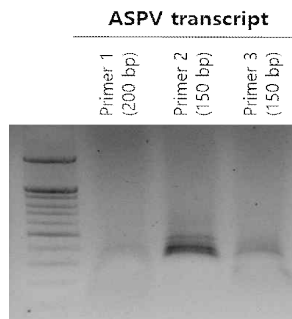


<그림 전-41> 사과 시료 ASPV 프라이머별 RT-RPA (10 pmol)



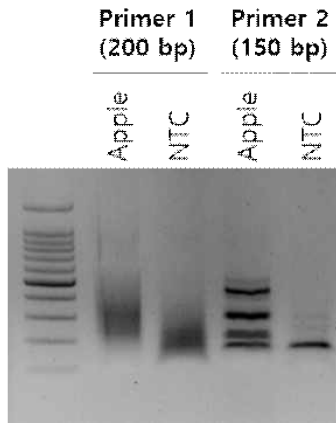
<그림 전-42> 사과 시료 ASPV 프라이머별 RT-RPA (5 pmol)

<그림 전-43> 사과 시료 ASPV 프라이머별 RT-PCR (5 pmol)

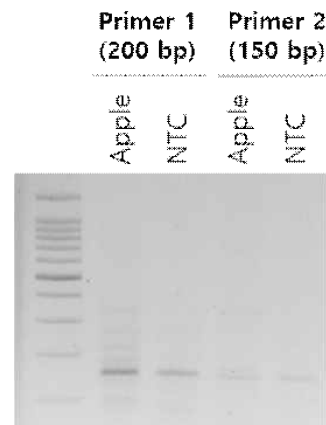


<그림 전-44> ASPV transcript RT-RPA (5 pmol)

- 앞서 제작한 3개의 프라이머는 사과 시료에서 정상적인 증폭이 이루어지지 않는다고 판단하여 이전 프라이머를 제작할 때 사용한 ASPV CP의 염기서열을 제외한 나머지 부분을 시퀀싱하여 염기서열을 확보하였음. 확보한 염기서열을 국내외 다른 ASPV 분리주들과 alignment하여 보존된 영역에서 프라이머를 2세트를 추가로 제작하였음(그림 전-40, 표 전-4).
- 추가 제작한 프라이머와 ASPV 감염 사과 시료를 사용하여 RT-RPA를 통해 증폭 여부를 실험함. RT-RPA반응은 Twist kit (TwistDX) 제품을 사용하여 제품의 protocol을 따라 수행되었음. Incubation 조건은 42 °C에서 30분간 진행하였음.
- 사과 시료에서 두 프라이머 모두 기대 size의 증폭이 확인되지 않음. NTC조건에서 비특이적인 증폭이 확인됨(그림 전-45).
- 프라이머 농도를 5 pmol로 낮추어 RPA 실험을 재진행하였으나, 모든 조건에서 비특이적인 증폭이 확인됨(그림 전-46).



<그림 전-45> ASPV RT-RPA(10 pmol)

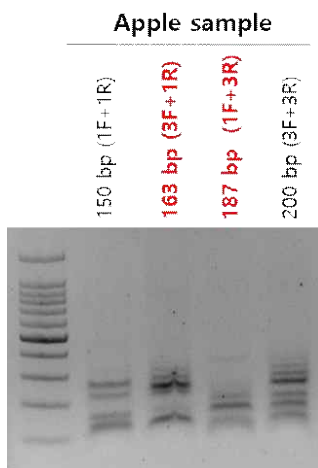


<그림 전-46> ASPV RT-RPA(5 pmol)

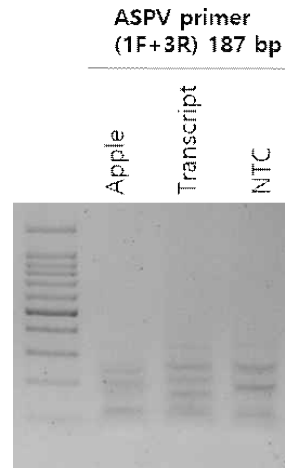
- 이전에 제작한 3세트의 프라이머에서 forward와 reverse 프라이머를 조합하여 각 조합별 프라이머 RPA 실험을 진행하였음.
- 표 와 같이 조합한 각 프라이머 별로 RT-RPA를 진행한 결과, 150 bp, 163 bp, 200 bp 에서는 비특이적인 증폭이 확인됨. 187 bp 프라이머의 경우 상대적으로 비특이적인 증폭 이 적고 기대 size의 증폭이 확인됨(그림 전-47).
- 187 bp 프라이머의 증폭 여부를 확인하기 위해, ASPV 감염 사과 시료와 ASPV transcript 를 주형으로 NTC조건과 함께 RPA 실험을 진행하였음. 그 결과, 모든 조건에서 비특이적 인 증폭이 확인됨(그림 전-48).

표 전-5. ASPV에 대한 RPA 프라이머 서열

프라이머	염기서열 5'-3'	증폭 크기(bp)
ASPV3 Fwd	CTGAAGAATATCAGATACGAGCCCCAAGCA	163
ASPV1 Rev	TGTCAGATGCTCCAACATCAGCACAGTGCC	
ASPV1 Fwd	CACAGGCGGTATGAGAAGCGACTTGATTC	187
ASPV3 Rev	AACATCAGCACAGTGCCTTGCTAAGTAAAC	



<그림 전-47> 프라이머 조합별 RT-RPA



<그림 전-48> 187 bp 프라이머 RT-RPA

▶ Filter paper를 통한 핵산 추출 방법

: “Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds” 논문의 protocol 대로 수행함.

* Extraction buffer: 800 mM guanidine hydrochloride, 50 mM Tris [pH 8], 0.5% Triton X100, 1% Tween-20

* wash buffer: 10 mM Tris [pH 8.0], 0.1% Tween-20

1. Whatman No.1 filter paper를 가로 세로 3mm로 잘라준다.
 2. 액체질소로 갈아준 식물 조직 5-10 mg를 1.5 ml tube에 옮겨준다.
 3. 50 ul의 extraction buffer를 식물 조직이 있는 1.5 ml tube에 분주한 후, plastic pestle로 30초 동안 갈아준다.
 4. 추출 버퍼에 갈아준 식물 조직에 filter paper disc를 넣고 상온에서 1분간 반응한다.
 5. 새로운 tube에 200 ul의 wash buffer를 분주한다. (2번 반복이므로 2개를 준비)
 6. 1분이 지난 filter paper disc를 tip를 사용하여 200 ul의 wash buffer에 옮기고 1분간 반응한다. (2번 반복)
 7. 2번의 wash 과정이 끝나면 filter paper disc를 현장 진단용 실험에 template 으로 사용하면 된다.
-
-

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2021~2022)	2단계 (2023~2023)	계	가중치 (%)
	전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문	목표(단계별)	1	1	2
실적(누적)			3	1	4	
특허출원		목표(단계별)	3	2	5	10
		실적(누적)	4	4	8	
생명자원		목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	2	0	2	
학술발표		목표(단계별)	2	1	3	10
		실적(누적)	5	1	6	
특허등록		목표(단계별)	0	1	1	20
		실적(누적)	0	0	0	
매출액		목표(단계별)	0	100,000	100,000	10
		실적(누적)	0	0	0	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾ 연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술실시	목표(단계별)	0	0	0	
		실적(누적)	13	5	18	
	제품화	목표(단계별)	0	2	2	20
		실적(누적)	13	5	18	
	고용창출	목표(단계별)	3	2	5	30
		실적(누적)	2	2	4	
계	목표(단계별)					
	실적(누적)					

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신제품 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	First report of cucumber mosaic virus infecting Clematis apiifolia in Korea	Journal of Plant Pathology	Dong-Kyung Nam	104	미국	Springer	sci	2022-07-04	1125-4653	100
2	Lupin (Lupinus polyphyllus) is a New Natural Host of Lily Symptomless Virus in Korea	Plant Disease	Sung-Woong Kim	106	미국	APS publications	sci	2022-07-01	1254-3333	100
3	First report of plantago asiatica mosaic virus infecting scarlet geranium (Pelargonium inquinans) worldwide	Journal of Plant Pathology	이효정	104	미국	Springer	sci	2022-07-13	1125-4653	100
4	First report of Corydalis speciosa Maxim. being a natural host plant for cucumber mosaic virus in Korea	Journal of Plant Pathology	Ye-Yeong Kim	105	미국	Springer	sci	2023-08-02	1125-4653	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년 한국식물병리학회 추계 온라인 학술대회	이효정, 정래동	2021-11-10	비대면	대한민국
2	2021년 한국식물병리학회 추계 온라인 학술대회	박지수, 민경근, 홍진성	2021-11-10	비대면	대한민국
3	2022추계 한국식물병리학회 학술발표대회	이효정, 김성웅, 김해준, 이형우, 홍진성, 정래동	2022-10-18	순천대학교	대한민국
4	2022추계 한국식물병리학회 학술발표대회	김해준, 이효정, 이형우, 홍진성, 정래동	2022-10-18	순천대학교	대한민국
5	2022추계 한국식물병리학회 학술발표대회	박태선, 민동주, 박지수, 홍진성	2022-10-18	순천대학교	대한민국
6	2023춘계 한국식물병리학회 학술발표대회	박태선, 박지수, 민동주, 홍진성	2023-04-27	경주 라한 셀렉트 호텔	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	쥬키니황화모자이크바이러스(Zucchini yellow mosaic virus)-MC1 분리주 외피단백질 염기서열	LC652434	NCBI	2021
2	Lily symptomless virus-IJ1 분리주 외피단백질 염기서열	LC652434	NCBI	2021

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	오이모자이크바이러스 검출용 RPA exo 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2021-11-10	10-2021-0153936					100	○
2	고추모틀바이러스 검출용 RPA assay 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2022-11-07	10-2022-0146971					100	○
3	고추약한모틀바이러스 검출용 RPA assay 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2022-11-07	10-2022-0146945					100	○
4	토마토반점위조바이러스 검출용 RPA exo probe 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2021-11-10	10-2021-0154002					100	○
5	나리 무병징 바이러스 검출용 RPA exo 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2023-11-09	10-2023-0154626					100	○
6	질경이모자이크바이러스 검출용 RPA exo 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2023-11-09	10-2023-054632					100	○
7	콩황반모자이크바이러 스 검출용 RPA exo 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2023-11-09	10-2023-0154616					100	○
8	감귤 트리스테자 바이러스 검출용 RPA exo 키트 및 그의 용도	대한민국	(주)엘씨엠 싸이언스	2023-11-09	10-2023-0154621					100	○

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	직접실시	Broad Bean Wilt Virus 2(BBWV2) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
2	직접실시	Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
3	직접실시	Turnip Mosaic Virus (TuMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
4	직접실시	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
5	직접실시	Soybean Yellow Mottle Mosaic Virus (SYMMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
6	직접실시	Soybean Yellow Common Mosaic Virus (SYCMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
7	직접실시	Soybean Mosaic Virus (SMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
8	직접실시	Ribgrass Mosaic Virus (RMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
9	직접실시	Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
10	직접실시	Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
11	직접실시	Pepper Mottle Virus (PepMoV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
12	직접실시	Cucumber Mosaic Virus (CMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
13	직접실시	Bean Common Mosaic Virus (BCMV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2022-12-01	0	0
14	직접실시	Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit 제조법	(주)엘씨엠사이언스	2023-07-10	0	0
15	직접실시	Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV) ER-Detection Kit 제조법	(주)엘씨엠사이언스	2023-07-10	0	0

16	직접실시	Citrus tristeza virus(CTV) ER-Detection Kit 제조법	(주)엘씨엠사이언스	2023-07-10	0	0
17	직접실시	Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) ER-Detection Kit 제조법	(주)엘씨엠사이언스	2023-07-10	0	0
18	직접실시	Lily Mottle Virus (LMoV) ER-Detection Kit제조법	(주)엘씨엠사이언스	2023-07-10	0	0

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
2	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Broad Bean Wilt Virus 2 (BBWV2) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
3	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Bean Common Mosaic Virus (BCMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
4	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Cucumber Mosaic Virus (CMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
5	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Pepper Mottle Virus (PepMoV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
6	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Peach latent mosaic viroid (PLMVd) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
7	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
8	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Ribgrass Mosaic Virus (RMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
9	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Soybean Mosaic Virus (SMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
10	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Soybean Yellow Common Mosaic Virus (SYCMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
11	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Soybean Yellow Mottle Mosaic Virus (SYMMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
12	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
13	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Turnip Mosaic Virus (TuMV)ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년
14	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠사이언스	-	-	-	20년

15	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Citrus Tristeza Virus (CTV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠 싸이언스	-	-	-	20년
16	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Lily Symptomless Virus (LSV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠 싸이언스	-	-	-	20년
17	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Lily Mottle Virus (LMoV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠 싸이언스	-	-	-	20년
18	자기실시	신제품개발	국내	작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발사업	Plantago Asiatica Mosaic Virus (PIAMV) ER-Detection Kit제조	(주)엘씨엠 싸이언스	-	-	-	20년

- * 1」 기술이전 또는 자기실시
- * 2」 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3」 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내			
국외					
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			yyyy년	yyyy년	
1	RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템 개발	(주)엘씨엠싸이언스	2021	2023	3
2	RPA probe assay를 이용한 주요작물의 식물병에 대한 현장진단 시스템 개발	강원대학교 산학협력단	2023	2023	1
합계					4

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	1
	개발 후	연구인력	2
		생산인력	2

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ RPA 적용을 위한 전처리 기술 개발	○ Whatman No.1 Filter paper를 이용하여 5분 만에 식물 시료에서 핵산을 쉽게 얻을 수 있는 방법을 확립하였고, 이를 통해 얻는 Filter paper-핵산을 사용하여 일반적인 RT-PCR과 현장진단용 기술인 RT-RPA, RT-RPA-LFS에 적용함	○ 100
○ 주요작물의 주요 병원균별 RPA probe DB 구축	○ 1년차에는 ASGV, ACLSV, BBWV2, CMV, PMMoV, PepMoV, TSWV 2년차에는 SMV, TuMV, TYMV, RMV, BCMV, SYCMV, SYMMV, ASPV, PLMVd 3년차에는 LMoV, LSV, PIAMV, GFkV, CTV, BYMV에 대한 진단을 위하여 RPA probe 데이터 베이스를 구축함	○ 100
○ 작물별 주요 바이러스 및 병충해에 대한 진단 한계 검증	○ 22종의 바이러스에 대한 진단제 개발 연구를 통해서 18종에 대한 민감도와 특이도 등의 한계를 검증하여 상업화에 성공하였음	○ 100
○ 주요작물(채소, 화훼류, 과실류 등 5건 이상)에 대한 현장진단 공정 설계 및 검증	○ 18종에 대한 진단제를 야외포장에서 간이핵산 추출버퍼로 핵산을 추출하여 40분안에 진단할 수 있음을 검증함	○ 100
○ 정성, 정량 분석법 PCR (Conventional RT-PCR, Real-time RT-PCR) 방식 및 immunostrip 방법 등과 진단 비교 및 분석	○ T8 UV scanner를 이용한 RPA probe법이 가장 높은 민감도를 보였고, 그 다음으로 RPA-PCRD 방식이 RPA probe방식에 버금가는 민감도를 보였으며, 프로브를 채택하지 않은 syber green I을 이용한 RPA진단법은 가장 낮은 민감도를 보였으나 가격적인 면에서는 최적으로 분석됨	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 채소, 화훼류에 대한 RPA probe는 설계한 대로 잘 작동을 하였으나 과실류는 육종에 의한 유전자변이가 매우 심하여 RPA probe 형성이 안되었다. 하지만 비로이드들에 대해서는 변이가 적어 프로브가 잘 작동하여 진단제를 만들 수 있었음

2) 자체 보완활동

-
- 프로브를 이용한 진단이 불가능한 경우를 대비하여 PCR 프라이머와 syber green I을 이용한 진단법을 개발하여 보완하였다. 이 또한 RPA 시약을 사용하여 개발한 진단법으로 프로브만 제외하고 RPA반응을 시켜서 증폭된 유전자 산물을 syber green I으로 사후 처리하여 육안 검사를 하는 방식이어서 15분안에 반응이 끝나고 결과 판독을 바로할 수 있는 장점이 있었음
 - 작물이 자라고 있는 경작 지역에서의 진단이 대단히 중요하다고 사료되어 현장 검사용으로 End point detection kit와 LFD kit를 개발하였습니다. 현장에서 작물바이러스의 유전자를 필터페이퍼법으로 추출하여 두가지 방법으로 검증하였습니다. 절차는 모두 같아서 22종 바이러스 모두를 실시할 필요는 없었습니다. 현장에서 충분히 개발한 진단기법이 적용됨을 확인하였습니다.
 - (주)엘씨엠싸이언스에서는 코로나진단제를 개발하여 FDA 승인을 신청하고, 해외 시장을 개척하는 과정에서 많은 네트워크를 만들어 놓았습니다. 해외바이어가 무엇을 원하는지 저희는 너무나도 잘 알고 있습니다. 어떻게 하면 해당 국가에서 우리의 진단제를 사용할 수 있을지도 잘 알고 있습니다. 해외 영업은 어느 정도 엘씨엠싸이언스의 노하우가 녹아있는 부분이어서 전부를 공개하기는 어려우나 딱한가지 바이어들이 원하는 것은 최고의 진단제입니다. 그래서 3년간은 최고의 진단제를 만들기 위한 경주를 다했으며, 앞으로 5년간은 매출을 위한 해외 진출을 모색할 것입니다.
 - (주)엘씨엠싸이언스에서는 자 회사로 모다자산운용사가 있습니다. 이 자산운용사를 통한 투자를 유치하여 나주에 작물바이러스 진단제 제조공장 허브를 착공할 예정입니다. 올 하반기부터 공장을 가동할 예정으로 그동안에는 마스크이나 인터넷을 통한 제품 홍보를 대대적으로 할 예정입니다.
 - 본 연구에서 개발된 18종의 실시간 진단제는 정밀진단이 필요한 국가연구기관, 검역기관이나 대학연구 기관을 대상으로 홍보를 중점적으로 수행할 계획이며, 아직 상품화는 되지 않았지만 RPA-LFD kit는 현장 사용의 편리성을 고려하여 농촌진흥청 산하 농촌지도소 등에 보급하여 현장에서 농민이 직접 혹은 현장 지도요원이 직접 사용할 수 있다는 점을 부각시켜 홍보와 판매를 진행할 계획입니다.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 주관연구개발기관인 (주) 엘씨엠사이언스에서는 현장 진단용 휴대용 T8 UV scanner에서 작동할 수 있는 RPA probe를 이용한 작물바이러스 진단제 18종을 연구개발에 성실히 임하였으며, 이를 통하여 18종의 진단제에 대한 기술실시와 제품화를 이루어내어 사업을 하고 있음
- 공동연구개발기관인 강원대학교 산학협력단에서는 RPA probe를 이용하여 현장에서 사용할 수 있는 간이분자진단기기의 일종인 PCR detector (PCRD)에서 작물바이러스 감염여부를 손쉽게 육안으로 판정하는 진단법을 성실히 개발하였음
- 위탁연구개발기관인 전남대학교 산학협력단에서는 비싼 RPA probe와 PCRD를 대체하여 가장 저렴하게 농가에 기술전파할 수 있는 syber green I을 이용한 육안 검출법을 완성하였음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 신규 도입 작물의 외래유입 바이러스의 무병화 및 안정적 생산
- 외래 바이러스의 국내 정착 방지
- 농업인의 안정적 고품질 농산물 생산에 기여
- 바이러스 무병 종자생산 기반 조성으로 종자산업의 세계화에 기여
- 국가 관리 농생명자원의 안전성 확보 및 외래유입 바이러스의 선제적 차단
- 정밀생육 기술 적용 품목 확대로 스마트팜 확산 기반 구축에 기여
- 바이러스병 농업현장용 진단키트 공급 확대 및 기술상용화 촉진
- 난방제 바이러스병의 조기 예방 및 고품질 농산물 생산에 기여

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

○ 활용 방안

- 과학적·합리적 식물바이러스 진단체계 확립
- 고위험 식물 바이러스 관리 기술 고도화를 통한 국내 농업 피해 최소화 활용
- 지역별 작물별 고위험 식물 바이러스 발생에 대한 이력 및 관리 체계 구축에 활용
- 농업인에게 바이러스 무병 종자 공급을 위해 종자전염 바이러스 발생실태를 구명하고, 유통종자, 채종지 및 육묘장 관리체계 구축에 활용가능
- 고위험 외래바이러스의 유입차단 및 바이러스 무병 농업유전자원의 확보를 위하여 국가 농업생명자원의 바이러스 감염실태 조사 및 관리체계 구축에 활용
- 고위험 식물바이러스에 대한 국내 유입 및 확산 조기 차단 활용
- 기 유입 바이러스의 유입 경로 추적을 통한 신규 유입에 대한 사전 차단 가능성 증대

○ 활용 계획

- 연구책임자는 지난해부터 필리핀 정부의 요청으로 바나나 질병인 파나마병 진단제 개발하고 있었으며, 이외에도 CMV, TSWV, TuMV, TYMV, BCMV 등 작물바이러스와 함께 아프리카돼지열병, 에이즈 진단제, 조류독감 진단제를 필리핀 클락에 부지를 제공하는 조건으로 우리 연구팀에게 현지 생산을 요청한 상태입니다. 필리핀 FDA와 농림부와 두차례 화상회의 하였고, 현지생산을 위한 투자금 조성을 진행중에 있습니다. 또한 본 연구책임자는 네팔 보건부에 국가방역자문위원으로 위촉받아 올해 하반기부터 현지에서 활동을 할 예정입니다. 네팔은 관광국가이기도 하지만 농업을 장려하는 국가이기도 합니다. 저의 네팔에서의 위치를 십분 활용하여 이번 연구에서 연구개발한 작물바이러스 진단제들을 수출할 예정입니다. 네팔은 가난한 나라임으로 우리나라의 EGCF 펀드를 이용하여 기부형태의 무역으로 네팔에 제공할 계획입니다.

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2024	2025	2026	2027	2028
국외논문	SCIE					
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내					
	국외					
특허등록	국내		2	2	2	2
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시					
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)		200,000	200,000	200,000	200,000
	기술료(단위 : 천원)		20,000	20,000	20,000	20,000
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

* 참고 문헌 *

■ LAMP 관련

- Chen HT, Zhang J, Liu YS, Liu XT. 2011. Detection of foot-and-mouth disease virus RNA by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology* 8: 510. doi: 10.1186/1743-422X-8-510.
- Chen HT, Zhang J, Liu YS, Liu XT. 2011. Rapid typing of foot-and-mouth disease serotype Asia 1 by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Virology* 8: 489. doi: 10.1186/1743-422X-8-489.
- Cho AR, Dong HJ, Cho SB. 2013. Rapid and sensitive detection of *Salmonella* spp. by using a loop-mediated isothermal amplification assay in duck carcass sample. *Korean J Food Sci An* 33: 655-663.
- Cho HS and Park NY. 2005. Detection of canine distemper virus in blood samples by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Vet Med B* 52: 410-413.
- Ding YZ, Zhou JH, Ma LN, Qi YN, Wei G, Zhang J, Zhang YG. 2014. A reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to rapidly diagnose foot-and-mouth disease virus C. *J Vet Sci* 15: 423-426.
- Dong HJ, Cho AR, Hahn TW, Cho SB. 2014. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification assay to detect shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle. *J Vet Sci* 15: 317-325.
- Dukes JP, King DP, Alexandersen S. 2006. Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Arch Virol* 151(6): 1093-1106.
- Farooq U, Latif A, Irshad H, Ullah A, Zahur AB, Naeem K, Khan SUH, Ahmed Z, Rodriguez L, and Smoliga G. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP): a new approach for the detection of foot-and-mouth disease virus and its sero-types in Pakistan. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, IJVR*, 16(4): 331-334.
- Fowler VL, Howson ELA, Madi M, Mioulet V, Caiusi C, Pauszek SJ, Rodriguez LL, King DP. 2016. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of vesicular stomatitis New Jersey virus: Use of rapid molecular assays to differentiate between vesicular disease viruses. *J Virol Methods*. 234: 123-131.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques* 46: 167-172.
- Hwang ES, Lee TU, Jung EY, Cho HS. 2011. Development of loop-mediated isothermal amplification method for the rapid and sensitive detection of bovine tuberculosis in Korea native cattle. *Korean J Vet Serv* 34: 333-339.
- Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Shin YK, Lee YJ, Yeo SG, Park CK. 2015. Evaluation of

- reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for screening influenza A viruses from different animal species. *J Anim Vet Adv* 14(6): 155-160.
- Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Shin YK, Lee YJ, Yeo SG, Park CK. 2016. Uracil-DNA glycosylase-treated reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of avian influenza virus preventing carry-over contamination. *J Vet Sci* 17(3): 421-425.
- Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Kim HJ, Shin YK, Song JY, Yeo SG, Park CK. 2015. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of swine influenza virus. *Korean J Vet Serv* 38: 107-116.
- Koh BRD, Kim JM, Sung CM, Ji TK, Na HM, Park SD, Kim YH, Kim ES. 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for differentiation of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis*. *Korean J Vet Serv* 36: 79-86.
- Kong HC, Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Kim HJ, Park YR, Kang DY, Kim YH, Park JC, Lee C, Yeo SG, Park CK. 2015. Visual detection of porcine circovirus 2 by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. *Korean J Vet Serv* 38(3): 145-153.
- Madhanmohan M, Nagendrakumar SB, Manikumar K, Yuvaraj S, Parida S, Srinivasan VA. 2013. Development and evaluation of a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid serotyping of foot-and-mouth disease virus. *J Virol Methods*. 187: 195-202.
- Mori Y; Notomi T. 2009. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 15: 62-69.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: 63-69.
- Park JY, Park SJ, Park YR, Kang DY, Kim EM, Jeon HS, Kim JJ, Kim WI, Lee KT, Kim SH, Lee KK, Park CK. 2016. Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the visual detection of European and North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J Virol Methods* 237: 10-13.
- Park BY, Shim KS, Kim WI, Hossain Md M, Kwon JK, Park CK, Cho SJ, Jo IH, Cho HS. 2015. Rapid and sensitive detection of *Lawsonia intracellularis* in pigs by loop-mediated isothermal amplification. *Acta Vet Beo* 65: 20-29.
- Shao, J.J., Chang, H.Y., Zhou, G.Q., Cong, G.Z., Du, J.Z., Lin, T., Gao, S.D., He, J.J., Liu, X.T., Liu, J.X., Gao, J.L., 2010. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Int J Appl Res Vet Med* 8: 133-142.
- Waters RA, Fowler VL, Armson B, Nelson N, Gloster J, Paton DJ, King DP. 2014. Preliminary Validation of Direct Detection of Foot-And-Mouth Disease Virus within Clinical Samples Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Coupled with a

Simple Lateral Flow Device for Detection. PLOS ONE 9(8), e105630

- Yamazaki W, Mioulet V, Murray L, Madi M, Haga T, Misawa N, Horii Y, King DP. 2013. Development and evaluation of multiplex RT-LAMP assays for rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus. J Virol Methods 192: 18-24.
- Yoo MS, Noh JH, Yoon BS, Reddy KE, Kweon CH, Jung SC, Kang SW. 2012. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. J Virol Methods 186: 147-151.
- Zhang XZ, Lowe SB, Gooding JJ. 2014. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Biosensors and Bioelectronics 61: 491-499.

■ RPA 관련

- Abd El Wahed A, et al., Recombinase polymerase amplification assay for rapid diagnostics of Dengue infection. PLoS One 2015, 10:6.
- Abd El Wahed A, et al., Reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for the detection of middle East respiratory syndrome coronavirus. PLoS Curr. 2013, 12:5.
- Abd El, et al. A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. PLoS One, 2013, 8:e71642
- Choi et al., A centrifugal direct recombinase polymerase amplification (direct-RPA) microdevice for multiplex and real-time identification of food poisoning bacteria. Lab chip, 2016, 16:2309-2316.
- Escadafal C, et al., Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. PLoS Negl. Trop. Dis. 2014, 8(3).
- Fay O, et al., Development and deployment of a rapid recombinase polymerase amplification Ebola virus detection assay in Guinea in 2015. Euro Surveill. 2015, 20(40). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.44.30053.
- Kersting S, et al., Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. 2014, 13:99.
- Kim JY and Lee JL. Rapid Detection of *Salmonella Enterica* Serovar Enteritidis from Eggs and Chicken Meat by Real-Time Recombinase Polymerase Amplification in Comparison with the Two-Step Real-Time PCR. Food Safety 2016, DOI:10.1111/jfs.12261.
- Kim JY and Lee JL. Development of a multiplex real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay for rapid quantitative detection of *Campylobacter coli* and *jejuni* from eggs and chicken products. Food control, 2017, 73: 1247-1255.
- Lillis L, et al., Cross-subtype detection of HIV-1 using reverse transcription and RPA. J. Virol. Methods 2016, 230:28-35.
- Lim SJ, et al., Rapid Detection of Black Queen Cell Virus from Honeybee using Reverse Transcription Real-Time Recombinase Polymerase Amplification (RT/RT RPA). J. Apicul. 2016, 31: 41-50.

- Mayboroda O, et al., Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. Anal. Bioanal. Chem. 2016, 408:671-6.
- Min SH, et al., Development of Quantitative Real-time Recombinase Polymerase Amplification (qRT-RPA) Method for Quantitative Detection against Pathogenic Virus in Honeybee. J. Apicul. 2016, 31:147-156.
- Ren H, et al., Development of a rapid RPA assay for detection of Brucella in blood samples. Mole. Cell. Probes 2016 DOI:10.1016/j.mcp.2016.02.007.
- Wang J, et al., Rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 by recombinase polymerase amplification. Arch Virol. 2016, Jan 5 (Epub ahead of print).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 작물바이러스 및 병해충대응 산업화 기술개발 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.