

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



PCT



(10) 국제공개번호
WO 2010/147372 A2

(43) 국제공개일
2010년 12월 23일 (23.12.2010)

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/003846
- (22) 국제출원일: 2010년 6월 15일 (15.06.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0053608 2009년 6월 16일 (16.06.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주) 바이오니아 (BIONEER CORPORATION)
[KR/KR]; 대전광역시 대덕구 문평동 49-3, 306-220 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 구완림 (KOO, Wan Lim) [KR/KR]; 대전광역시 동구 용계동 252-12, 300-450 Daejeon (KR). 김성열 (KIM, Seong Youl) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 송파2동 삼성아파트 101-803, 138-778 Seoul (KR). 박해준 (PARK, Hae Joon) [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 806-1403, 463-911 Gyeonggi-do (KR). 박한오 (PARK, Han-Oh) [KR/KR]; 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 208동 601호, 305-761 Daejeon (KR). 변상진 (BYUN, Sang-Jin) [KR/KR]; 대전광역시

서구 갈마동 위너스빌 1차 1101호, 302-170 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP GROUP); 서울특별시 강남구 역삼동 647-15 한국타이어빌딩, 135-723 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

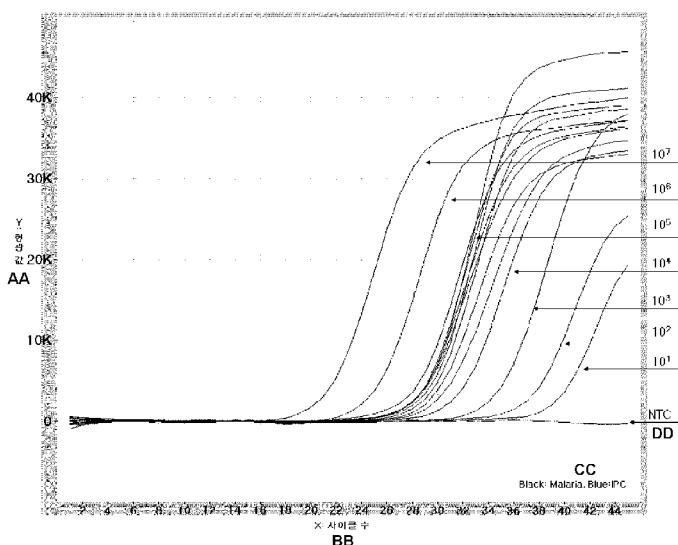
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PRIMER AND PROBE FOR DETECTING MALARIA PLASMODIUM AND DETECTION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 말라리아 원충 검출용 프라이머, 탐침 및 이를 이용한 검출방법

[Fig. 20]



BB ... X: Number of cycles
AA ... Fluorescence value
CC ... Black: Malaria, Blue: IPC
DD ... NTC

(57) Abstract: The present invention relates to a primer and a probe for detecting malaria plasmodium and a detection method using the same, and more particularly, to a primer and a probe for detecting genes of malaria plasmodium existing in a biological sample and an environmental sample, and to a method for detecting genes of malaria plasmodium through a polymerase chain reaction using the primer and the probe. The present invention detects malaria plasmodium in a quicker and more accurate manner as compared with conventional malaria plasmodium detection methods, and detects malaria plasmodium at one time in a real-time basis even in cases where *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* are mixed in a sample. In addition, a dried mixture for a polymerase chain reaction, containing the primer and the probe, can be stored while maintaining the performance of the mixture the same as that of the liquid state, and therefore, can be used for a detection kit.

(57) 요약서: 본 발명은 말라리아 원충 검출용 프라이머, 탐침 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 생물학적 시료 및 환경 시료에 존재하는 말라리아 원충의 유전자를 검출하기 위한 프라이머, 탐침 및 이를 이용한 증폭효소 연쇄반응으로 말라리아 원충의 유전자를 검출하는 방법에

[다음 쪽 계속]

WO 2010/147372 A2

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

관한 것이다. 본 발명에 따르면, 종래의 말라리아 원충 검출방법에 비해 신속하고 정확하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 시료 내에 열대열 말라리아(*Plasmodium falciparum*), 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*), 사일열 말라리아(*Plasmodium malariae*), 난형 말라리아(*Plasmodium ovale*)가 혼재되어 있을지라도 한번에 실시간으로 검출가능하다. 또한 상기 프라이머 및 탐침을 포함하는 중합효소 연쇄반응 혼합물의 건조물은 용액 상태와 동등한 성능으로 보관 기간이 향상되므로 검출 키트에 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 말라리아 원충 검출용 프라이머, 탐침 및 이를 이용한 검출방법

기술분야

- [1] 말라리아 원충 검출용 프라이머, 탐침 및 이를 이용한 검출방법, 보다 상세하게는 생물학적 치료 및 환경 치료에 존재하는 말라리아 원충의 유전자를 검출하기 위한 프라이머, 탐침 및 이를 이용하여 중합효소 연쇄반응으로 말라리아 원충을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 말라리아는 포자충(*Sporozoa*) 강의 플라스모디움(*Plasmodium*) 속에 속하는 원충이 적혈구나 간세포 내에 일으키는 질병으로, 2000년 세계보건기구가 결핵, 후천성 면역 결핍증과 함께 퇴치해야 할 3대 감염 질환으로 선포할 만큼 세계적으로 심각한 질병으로 여겨지고 있고, 세계의 40% 이상의 지역에서 유행하며, 100개국 이상에서 30억 이상의 인구가 이 질병에 노출되어 있다. 이 중 매년 약 2-3억 명의 환자가 발생하며, 비록 사망의 85% 정도가 아프리카 지역에서 일어나고 있지만, 소아, 임산부, 비 면역 질환자 및 여행자 등의 고 사망 위험군을 중심으로 한 해에 100만명 이상이 사망하고 있는 것으로 알려져 있다.
- [4] 말라리아는 전염성이 매우 높은 질환으로 병원충이 인체의 적혈구를 감염시켜 증상이 나타나며, 말라리아 원충이 말초 혈액에 주입되면 일단 간세포 내에서 분열 증식하여 적혈구에 기생하기 시작할 때까지 1~2주 또는 수개월까지 잠복기를 거친다. 급성기 환자는 처음 수분에서 1~2시간 동안 오한, 두통, 구역질 등을 보이며, 피부가 따뜻하고 건조해지며 호흡과 맥박이 빨라지는 발열기(3~6시간 이상)를 거쳐 땀을 흘리는 발한기로 이어지는 것이 보통이다.
- [5] 현재까지 인체에 말라리아 감염을 일으킨다고 알려진 플라스모디움(*Plasmodium*) 속에는 열대열 말라리아(*Plasmodium falciparum*), 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*), 사일열 말라리아(*Plasmodium malariae*), 난형 말라리아(*Plasmodium ovale*) 4 종이 있다. 이들 중에 열대열 말라리아와 삼일열 말라리아가 한국 말라리아 환자의 대부분을 차지하며, 말라리아 환자 치료를 위해 빠르고 정확한 말라리아 원충 검출이 요구되고 있다.
- [6] 말라리아 원충 검출에 사용되고 있는 전통적인 방법인 말초 혈액 도말법은 혈액 도말을 검사(Giemsa)나 화이트(Wight) 염색한 후 현미경으로 관찰하는 방법으로, 믿을만한 말라리아 검출법이지만 많은 시간과 노력이 요구되는 동시에 오랜 경험과 숙련을 필요로 하는 단점이 있다. 이와 같은 단점을 보완하기 위하여, 간접 면역 형광 항체법(indirect fluorescence assay; IFTA), 효소 면역법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), DNA나 RNA 탐침을 이용한

교잡반응 방법 등이 개발되고 있으나, 이들 방법에는 특수한 장비가 필요하고 과정이 복잡한 단점이 있다.

- [7] 이에 본 발명자들은 연구결과 말라리아 원충 특이적 프라이머와, 추가적으로 내부 대조군(internal control)을 고안하여 종래 말라리아 검출방법에 비해 말라리아 원충 유전자를 높은 특이도(민감도)로 신속하고 정확하게 검출할 수 있을 뿐만 아니라 시료 내에 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아가 혼재되어 있을지라도 검출할 수 있는 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 또한, 본 발명의 중합효소 연쇄반응 조성물의 건조물은 용액 상태의 조성물과 성능은 동등하게 유지되고 보관 기간은 길다는 점에서 특징점을 지닌다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 시료 내의 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아를 실시간으로 검출할 수 있는 말라리아 원충 유전자 검출방법을 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 제1은 삼일열 말라리아 원충 18S 리보솜 RNA 유전자의 염기서열의 일부 또는 그 상보적인 염기서열의 일부를 포함하는 말라리아 검출용 프라이머를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명의 제2는 상기 염기서열의 일부는 상기 RNA 유전자의 350 내지 1180 번째 염기 내의 5 내지 40 개의 염기서열인 말라리아 검출용 프라이머를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명의 제3은 서열번호 1 내지 10으로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출용 프라이머를 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명의 제4는 삼일열 말라리아 원충 18S 리보솜 RNA 유전자의 염기서열의 일부 또는 그 상보적인 염기서열의 일부, 경우에 따라 리포터 및 소광제를 더 포함하는 말라리아 검출용 탐침을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명의 제5는 상기 염기서열의 일부는 상기 RNA 유전자의 350 내지 1180 염기 내의 5 내지 40 개의 염기서열인 말라리아 검출용 탐침을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명의 제6은 서열번호 11 내지 15로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출용 탐침을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명의 제7은 상기 1의 말라리아 검출용 프라이머 및 상기 4의 말라리아 검출용 탐침을 포함하는 말라리아 검출용 키트를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명의 제8은 상기 말라리아 검출용 키트는 내부 대조군용(internal control) 유전자, 프라이머 및 탐침을 더 포함하는 말라리아 검출용 키트를

제공한다.

[19] 또한, 본 발명의 제9는 상기 말라리아 검출용 키트는 건조 타입인 말라리아 검출용 키트를 제공한다.

[20] 또한, 본 발명의 제10은 상기 내부 대조군용 유전자, 프라이머 및 탐침은 *Mus musculus dishevelled, dsh homolog 1(Drosophila)(Dvl1)* 유전자(GenBank. Accession No. NM010091)의 염기서열로부터 유래된 것인 말라리아 검출용 키트를 제공한다.

[21] 또한, 본 발명의 제11은 상기 내부 대조군용 프라이머가 서열번호 16 내지 21로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 내부 대조군용 탐침이 서열번호 22 내지 24로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출용 키트를 제공한다.

[22] 또한, 본 발명의 제12는

[23] 1) 검체를 주형으로 상기 1의 말라리아 검출용 프라이머와 상기 4의 말라리아 검출용 탐침을 사용하여 중합효소 연쇄반응 또는 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계; 및

[24] 2) 상기 1) 단계의 증폭 산물에 대해 형광값을 조사하는 단계를 포함하는 말라리아 검출방법을 제공한다.

[25] 또한, 본 발명의 제13은 상기 연쇄반응을 수행하는 단계는 내부 대조군용 유전자, 프라이머, 탐침을 추가로 사용하여 수행하는 말라리아 검출방법을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명의 제14는 상기 내부 대조군용 유전자, 프라이머 및 탐침은 *Mus musculus dishevelled, dsh homolog 1(Drosophila)(Dvl1)* 유전자(GenBank. Accession No. NM010091)의 염기서열로부터 유래된 것인 말라리아 검출방법을 제공한다.

[27] 아울러, 본 발명의 제15는 상기 내부 대조군용 프라이머가 서열번호 16 내지 21로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 내부 대조군용 탐침이 서열번호 22 내지 24로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출방법을 제공한다.

[28]

[29] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[30] 본 발명은 실시간 중합효소 연쇄반응 또는 일반적인 중합효소 연쇄반응을 통해 말라리아 DNA를 검출하는데 필요한 프라이머 및 탐침을 제공한다.

[31] 본 발명의 실시간 중합효소 연쇄반응은 프라이머와 형광물질이 화학적으로 결합하여 있는 올리고뉴클레오타이드 탐침을 사용함으로써 반응 결과를 실시간으로 모니터링한다. 이 탐침은 중합효소 연쇄반응 과정에서 두 개의 프라이머와 같이 검체의 핵산에 있는 상보서열에 결합하게 되는데 위치는 프라이머에서 약간 떨어진 부분이다. 본 발명의 탐침은 양끝에 리포터(reporter)와 소광제(quencher)라는 형광물질이 붙어 있는 구조일 수 있으며, 이 경우 리포터와 소광제가 근접하여 존재하면 형광을 서로 상쇄하여

리포터의 형광이 감지되지 않으나, 증폭이 진행됨에 따라 리포터가 소광제로부터 떨어지면 리포터의 형광이 감지되는 것이다. 따라서 형광의 강도는 증폭 사이클이 증가함에 따라 점점 증가하게 된다.

- [32] 본 발명의 프라이머 및 탐침은 삼일열 말라리아 원충 18S 리보솜 RNA 유전자, 예컨대 *Plasmodium vivax* 18S ribosomal RNA gene, GenBank Accession No. U93233의 일부 또는 그 상보적 염기서열의 일부를 포함하는 것으로서, 바람직하게는 상기 염기서열의 350 부터 1180 번째 염기 내의 5 내지 40 개, 바람직하게는 19 내지 25개의 염기서열로 구성되고, 보다 바람직하게는 서열번호 1 내지 5로 기재되는 염기서열인 정방향 프라이머 및 서열번호 6 내지 10으로 기재되는 염기서열인 역방향 프라이머이다. 또한, 탐침은 서열번호 11 내지 15로 기재되는 5개이며 모두 정방향 탐침이다.
- [33] 본 발명의 프라이머 및 탐침은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 플라스모디움(*Plasmodium*) 속 중 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아 4 종의 유전자 서열을 정렬(alignment)하여 상동성이 높은 부분을 확인한 후 100% 매치되는 부분의 서열을 바탕으로 제작하였다(도 1 참조). 따라서, 본 발명의 프라이머 및 탐침을 이용하면 상기 4종의 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아를 제한없이 한번에 검출할 수 있다.
- [34]
- [35] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 또는 탐침을 포함하는 말라리아 유전자 검출용 키트를 제공한다.
- [36] 상기 키트는 본 발명의 프라이머 또는 탐침 외에 증폭용 완충용액, dNTP, 대조군, 검출 시약 등을 추가적으로 포함할 수 있으며, 액상 또는 건조 타입으로 제공될 수 있고, 반응에 영향이 없는 경우에 한하여 목적에 따라 추가적인 성분을 포함할 수 있다. 건조 상태로 제공되는 키트는 보관 안정성이 향상되어 오랜 기간 사용이 가능하며, 현미경 관찰 시험과 비례하는 정량 상관계수를 가짐으로써, 보다 빠른 시간 내에 정확한 정량값을 얻을 수 있다.
- [37] 상기 키트는 추가로 내부 대조군용 프라이머 및 탐침을 포함할 수 있다. 상기 프라이머는 예컨대 *Mus musculus* *dishevelled, dsh* homolog 1(*Drosophila*)(Dvl1) 유전자(GenBank. Accession No. NM010091)의 일부 또는 그 상보적 염기서열의 일부를 포함하는 것으로서, 바람직하게는 상기 염기서열의 942 부터 1708 번째 염기 내의 5 내지 40 개의 염기서열로 구성되고, 보다 바람직하게는 서열번호 16 내지 18로 기재되는 염기서열인 정방향 프라이머 및 서열번호 19 내지 21로 기재되는 염기서열인 역방향 프라이머이다. 또한, 탐침은 서열번호 22 내지 24로 기재되는 3개이며 모두 정방향 탐침이다.
- [38] 내부 대조군용 프라이머 및 탐침은 테스트시 양성 대조군으로서, 본 발명을 이용하여 (실시간) 중합효소 연쇄반응을 수행시 음성 판정이 나왔을 때, 즉 시료에 말라리아 원충이 존재하지 않는 것으로 나왔을 때 그 결과가 실험상의

실수인지 또는 실제 말라리아 원충이 존재하지 않는 것인지 검증하기 위해 필요한 것으로서, 본 발명의 말라리아 프라이머 세트와 함께 증폭할 때 말라리아 검출을 방해하지 않아야 한다. 상기 내부 대조군이 양성으로 나타날 경우 중합효소 연쇄반응 자체는 문제가 없음을 나타낸다.

- [39] 상기 말라리아 검출용 또는 내부 대조군용 프라이머 및 탐침들은 프라이머 2개(정방향 1개, 역방향 1개) 탐침 1개의 구성이면 임의의 조합이 가능하나, 바람직하게는 서열번호 1로 기재되는 정방향 프라이머, 서열번호 6으로 기재되는 역방향 프라이머 및 서열번호 11로 기재되는 정방향 탐침을 사용할 수 있다. 상기 내부 대조군용 프라이머 및 탐침들 또한 프라이머 2개(정방향 1개, 역방향 1개) 탐침 1개의 구성이면 임의의 조합이 가능하나, 바람직하게는 서열번호 16으로 기재되는 정방향 프라이머, 서열번호 19로 기재되는 역방향 프라이머 및 서열번호 22로 기재되는 정방향 탐침을 사용할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 실시간 중합효소 연쇄반응 뿐 아니라 일반적인 중합효소 연쇄반응에도 사용될 수 있다. 말라리아 탐침의 리포터는 FAM(6-carboxyfluorescein), 소광제는 BHQ1(2,5-di-tert-butylhydroquinone-1)을 사용하는 것이 바람직하고, 내부 대조군용 탐침의 리포터는 TAMRA(Carboxy-tetramethyl-hod-amine), 소광제는 BHQ1을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[40]

[41] 아울러, 본 발명은

[42] 1) 검체를 주형으로 상기 1의 말라리아 검출용 프라이머와 상기 4의 말라리아 검출용 탐침을 사용하여 중합효소 연쇄반응 또는 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계; 및

[43] 2) 상기 1) 단계의 증폭 유무 또는 증폭 산물에 대한 형광값을 조사하는 단계를 포함하는 말라리아 검출방법을 제공한다.

[44] 본 발명의 검출방법에 의하면, 민감도가 높아 매우 적은 양의 말라리아 원충의 핵산이 시료 내에 존재하더라도 말라리아 원충을 검출할 수 있으며 특히 실시간 중합효소 연쇄반응의 경우 증폭이 진행되는 동안 곧바로 증폭여부를 관찰할 수 있고 별도의 증폭산물 확인단계가 필요하지 않아 검출 시간을 줄일 수 있다.

[45]

발명의 효과

[46] 본 발명의 프라이머, 탐침 및 검출방법을 사용하면 기존에 사용되던 검출방법들에 비해 4종의 말라리아 원충의 유전자를 신속하고 간편하게 검출할 수 있으며, 민감도가 높아 시료 내에 존재하는 매우 낮은 농도의 말라리아 원충의 유전자까지도 정확하게 검출할 수 있다.

[47]

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST를 이용하여 플라스모디움(*Plasmodium*) 속 중 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아 4 종의 유전자 서열을 정렬(alignment)하여 상동성이 높은 부분을 확인한 것으로(A), 100% 매치되는 부분을 검정색으로 표시하였다(B). 상기 상동성 있는 서열을 바탕으로 본 발명의 프라이머 및 탐침을 제작하였다.
- [49] 도 2 내지 도 12는 서열번호 1 내지 15로 기재되는 본 발명의 말라리아 프라이머 및 탐침의 모든 조합으로 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems사제, 미국) 기기를 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시한 후, PCR 효율이 좋은 세트 11개를 선별하여 다시 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [50] 도 2 내지 도 10: Tm 55°C 조건의 프라이머 및 탐침 9개로 증폭
- [51] 도 11 및 도 12: Tm 65°C 조건의 프라이머 및 탐침 6개로 증폭
- [52] 도 13은 서열번호 16 내지 24로 기재되는 본 발명의 내부 대조균용 DNA의 프라이머 및 탐침의 조합으로 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems사제, 미국) 기기를 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과를 나타낸 그래프이다. 그래프 우측의 숫자는 테스트 번호 1-8이다.
- [53] 도 14는 서열번호 1, 6, 11 및 서열번호 16, 19, 22 로 기재되는 본 발명의 프라이머 및 탐침의 조합으로 실시간 중합효소 연쇄반응기기 Exicycler™96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용한 말라리아 표준 주형의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 그래프를 나타낸다.
- [54] 녹색 곡선: 각각 $10 \sim 10^7$ 카피 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선
- [55] 오렌지색 곡선: 자체 제작한 내부 대조균용 DNA에 의한 증폭곡선
- [56] NTC: 음성 대조군으로서 공시험
- [57] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [58] 도 15는 서열번호 1, 6, 11 및 서열번호 16, 19, 22 로 기재되는 본 발명의 프라이머 및 탐침의 조합으로 Exicycler™96 Real-Time Quantitative Thermal block을 사용한 농도별 말라리아 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타낸다(기울기: -0.3015, R²: 1.0000).
- [59] 도 16은 서열번호 1, 6, 11 및 서열번호 16, 19, 22 로 기재되는 본 발명의 프라이머 및 탐침의 조합으로 실시간 중합효소 연쇄반응기기 7500 Fast Real-Time PCR System를 사용한 말라리아 표준 주형의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 그래프를 나타낸다.
- [60] 녹색 곡선: $10 \sim 10^7$ 카피 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선
- [61] 검은색 곡선: 자체 제작한 내부 대조균용 DNA에 의한 증폭곡선
- [62] NTC로 표기된 것은 음성 대조군으로서 공시험
- [63] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [64] 도 17은 7500 Fast Real-Time PCR System을 사용한 농도별 말라리아 표준 주형

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타낸다(기울기: -3.6467, R^2 : 0.9995).

- [65] 도 18은 서열번호 1, 6, 11 및 서열번호 16, 19, 22로 기재되는 본 발명의 프라이머 및 탐침의 조합으로 실시간 중합효소 연쇄반응기기 iQTM5 Real-Time PCR Detection System를 사용한 말라리아 표준 주형의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 그래프를 나타낸다.
- [66] 검은색 곡선: $10 \sim 10^7$ 카피 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선
- [67] 파란색 곡선: 자체 제작한 내부 대조균용 DNA에 의한 증폭곡선을 나타낸다.
- [68] NTC: 음성 대조군으로서 공시험
- [69] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [70] 도 19는 iQTM5 Real-Time PCR Detection System을 사용한 농도별 말라리아 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타낸다(기울기: -3.140, R^2 : 0.999).
- [71] 도 20은 서열번호 1, 6, 11 및 서열번호 16, 19, 22로 기재되는 본 발명의 프라이머 및 탐침을 포함하는 건조 상태의 PCR 조성물을 이용한 말라리아 표준 주형의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 그래프를 나타낸 것으로 실시간 중합효소 연쇄반응기기 ExicyclerTM96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용한 것이다.
- [72] 검은색 곡선: $10 \sim 10^7$ 카피 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선
- [73] 파란색 곡선: 자체 제작한 내부 대조균용 DNA에 의한 증폭곡선
- [74] NTC: 음성 대조군으로서 공시험
- [75] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [76] 도 21은 ExicyclerTM96 Real-Time Quantitative Thermal block을 사용하여 건조 상태의 PCR 혼합물에 농도별 말라리아 표준 주형을 적용한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타낸다(기울기: -0.3005, R^2 : 0.9995).
- [77] 도 22는 건조 상태의 PCR 혼합물을 이용한 말라리아 표준 주형의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 그래프를 나타낸 것으로 실시간 중합효소 연쇄반응기기 ExicyclerTM96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용한 것이다.
- [78] 검은색 곡선: $10 \sim 10^{10}$ 카피 농도별 말라리아 표준 주형의 증폭곡선
- [79] NTC: 음성 대조군으로서 공시험
- [80] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [81] 도 23은 건조 상태의 PCR 혼합물의 보관안정성 시험을 위하여 액체 상태의 PCR 혼합물인 대조군을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이다. 실시간 중합효소 연쇄반응기기 ExicyclerTM96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하였으며, $10^3 \sim 10^7$ 카피 농도의 말라리아 표준 주형에 대하여 시험을 진행한 것이다.
- [82] 검은색 곡선: 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선

- [83] 파란색 곡선: 자체 제작한 내부 대조군용 DNA의 증폭곡선
- [84] NTC: 음성대조군으로서 공시료
- [85] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [86] 그래프 하단의 수식은 농도별 말라리아 표준 주형을 적용한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타내는 것으로 기울기: -0.2958, R^2 : 0.9999 값을 나타낸다.
- [87] 도 24 내지 도 31은 건조 상태의 PCR 혼합물의 보관안정성 시험을 위하여 건조한 PCR 혼합물을 40도에 보관한 뒤, 하루 간격으로 총 8일간의 보관 기간에 대하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이다. 실시간 중합효소 연쇄반응기기 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하였으며, $10^3 \sim 10^{10}$ 카피 농도의 말라리아 표준 주형에 대하여 시험을 진행한 것이다.
- [88] 검은색 곡선: 농도별 말라리아 주형 DNA의 증폭곡선
- [89] 파란색 곡선: 자체 제작한 내부 대조군용 DNA의 증폭곡선
- [90] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [91] 그래프 하단의 수식은 농도별 말라리아 표준 주형을 적용한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 그래프의 표준 곡선을 나타내는 것으로 기울기 -2.78~3.05, R^2 값은 0.9989~0.9999의 범위에서 각 보관 일수별로 값이 표기되어 있다. 1일~8일로 표기된 것은 40°C에서 총 보관된 일수를 나타낸다.
- [92] 도 32는 말라리아(*P. falciparum*) 양성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이며 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이다.
- [93] 검은색: 말라리아 증폭곡선
- [94] 파란색: 내부 대조군용 DNA의 증폭 곡선
- [95] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [96] 도 33은 말라리아(*P. vivax*) 양성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이며 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이다.
- [97] 검은색: 말라리아 증폭곡선
- [98] 파란색: 내부 대조군용 DNA의 증폭 곡선
- [99] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [100] 도 34는 말라리아 음성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이며 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이다.
- [101] 검은색: 말라리아 증폭곡선
- [102] 파란색: 내부 대조군용 DNA의 증폭 곡선
- [103] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [104] 음성 검체의 경우 NTC(공시료) 결과와 유사하게 말라리아의 증폭 곡선이

나타나지 않는다.

- [105] 도 35는 MTB(*Mycobacterium tuberculosis*) 양성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이며 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이다.
- [106] 검은색: 말라리아 증폭곡선
- [107] 파란색: 내부 대조군용 DNA의 증폭 곡선
- [108] IPC: 내부 대조군(internal positive control)
- [109] MTB 양성 검체의 경우 NTC(공시험) 결과와 유사하게 말라리아의 증폭 곡선이 나타나지 않는다.
- [110] 도 36은 말라리아 4종의 양성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 그래프이며 Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이다.
- [111] Pf: 열대열 말라리아, Pv: 삼일열 말라리아(*Plasmodium vivax*), Ov: 난형 말라리아(*Plasmodium ovale*), MA: 사일열 말라리아(*Plasmodium malariae*) 양성 검체의 증폭곡선을 각각 나타내는 것으로 녹색으로 나타난다.
- [112] 도 37은 말라리아 4종의 양성 검체로부터 DNA를 추출하고, 건조된 PCR 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였을 때의 Ct 값 및 농도 결과를 나타낸 것이다. Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal block를 사용하여 얻은 결과이며, 각 결과는 두 번 실험하여 얻은 수치이다.
- [113] 도 38은 SPSS 14.0v 프로그램을 사용하여 얻은 결과 그래프로, 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 얻은 증폭 곡선의 Ct 결과값과, 현미경 관찰시험을 통해 얻은 말라리아 원충 수 사이의 상관관계를 나타낸다($r = -0.320$, $P < 0.01$).

[114]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [115] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용을 한정하지는 않는다.

[116]

[117] 실시예 1. 주형 DNA 및 내부 대조군용 DNA 제조

- [118] 이후에 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하기 위해, 먼저 주형 DNA를 제조하였다. 플라스모디움(*Plasmodium*) 속 중 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아, 난형 말라리아 4 종의 서열을 정렬(alignment)하여 상동성이 높은 부분을 확인하였다(도 1의 (B)). 그 후에 상동성이 높은 서열 중 하나인 *Plasmodium vivax* 18S ribosomal RNA 유전자(GenBank Accession No. U93233)에서 프라이머 및 탐침 서열을 포함하는 51번째 내지 880번째 서열인 830 bp를 유전자 합성방법(*NBiochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 248, 200-203)으로 합성하고 이를 pGEM-T-Easy Vector(Cat: A1360, Promega사제,

미국)에 클로닝 하였다.

- [119] 구체적으로 2X rapid ligation buffer(Promega사제, 미국) 5 μ l, T-Easy Vector(Promega사제, 미국) 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l(Promega사제, 미국), 유전자 합성물질 3 μ l(8 ng)를 동일한 튜브에 넣어 혼합한 다음 37°C에서 1시간 정온 배치하였다. 그 후, *E. coli* 만능세포(competent cell) 50 μ l에 상기의 정온 배치한 반응액 5 μ l을 넣고 얼음 상에 30분간 놓아둔 뒤 42°C에서 90초 배양하고 다시 얼음 상에 2분 놓아두었다. 앰피실린, IPTG, X-Gal이 포함된 LB 플레이트에 상기 반응액을 접종한 후 37°C에서 16시간 배양하였다.
- [120] 색이 흰 콜로니를 취하여 LB 액체 배지에서 16시간 정도 배양한 후 원심 분리하여 상층액은 버리고 Accuprep plasmid DNA prep kit(Bioneer사제, 한국)를 사용하여 펠렛으로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 플라스미드 DNA는 UV 분광계(Shimadzu사제, 일본)로 농도와 순도를 측정한 다음 순도가 1.8~2.0 사이인 것을 확인하였고, 농도 측정 결과를 바탕으로 DNA 카피 수(copy number)를 아래의 공식에 의하여 계산하였다.
- [121] $6.02 \times 10^{23} \times \text{농도}(\text{UV 분광계로 측정된 농도 g/ml}) / (3015 + 830) \times 660$ [3015 bp: T-easy vector의 크기, 830bp: 말라리아 주형 DNA의 크기]
- [122] 주형 DNA의 카피 수를 계산한 다음 1X TE buffer(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA)로 10진 희석하여 사용시까지 -70°C에 보관하였다.
- [123] 상기 주형 DNA 제조와 같은 방법으로 내부 대조군용 DNA를 제조하였다. 내부 대조군용 DNA는 음성 결과가 나왔을 때, 그 음성 결과가 증폭 오류에 의한 것이 아님을 확인하기 위해 필요하다.
- [124] *Mus musculus* dishevelled, dsh homolog 1(*Drosophila*)(Dvl1) 유전자(GenBank Accession No. NM010091)에서 프라이머 및 탐침 서열을 포함하는 928번째 내지 1647번째 서열인 767 bp 부위를 유전자 합성하여 내부 대조군용 DNA 제조에 이용하였고, 추출한 플라스미드 DNA의 농도 측정 결과를 바탕으로 DNA 카피 수를 아래의 공식에 의하여 계산하였다.
- [125] $6.02 \times 10^{23} \times \text{농도}(\text{UV 분광계로 측정된 농도 g/ml}) / (3015 + 767) \times 660$ [3015 bp: T-easy vector의 크기, 767bp: 내부 대조군용 DNA의 크기]
- [126] 내부 대조군용 DNA의 카피 수를 계산한 다음 1X TE buffer(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1mM EDTA)로 10진 희석하여 사용시까지 -70°C에 보관하였다.
- [127]
- [128] 실시예 2. 프라이머 및 탐침 디자인
- [129] 말라리아 18S rRNA(GenBank Accession No. U93233)의 염기서열 350 부터 1180 사이에서 길이는 19~25 bp, Tm 값은 55°C 내지 65°C가 되도록 임의로 염기서열을 선택하여 정방향 및 역방향 프라이머로 하였다. 또한, 염기서열 350 부터 1180 사이에서 길이는 20~30 bp 사이, Tm 값은 67~77°C 사이에서 임의로 염기서열을 선택하여 탐침으로 하였고, Tm 값은 Primer3Plus 프로그램을 사용하여 체크하였다(표 1).

- [130] 내부 대조군용 *Mus musculus* dishevelled, dsh homolog 1(*Drosophila*) (Dvl1) 유전자(GenBank. Accession No. NM010091)의 염기서열 942 부터 1708 사이에서 길이는 17~23 bp, Tm 값은 55°C 내지 62°C가 되도록 임의로 염기서열을 선택하여 정방향 및 역방향 프라이머로 하였다. 또한, 염기서열 942 부터 1708 사이에서 길이는 19~30 bp 사이, Tm 값은 67~72°C 사이에서 임의로 염기서열을 선택하여 탐침으로 하였고, Tm 값은 Primer3Plus 프로그램을 사용하여 체크하였다(표 2).
- [131] 우선, 말라리아의 모든 프라이머와 탐침을 세트로 조합한 후 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems사제, 미국)을 이용하여 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 진행하였다. 구체적으로 10X Buffer 5 μ l, wTfi polymerase 2.5U, dNTP 20mM 5 μ l, Thermostable Pyrophosphatase, PPI, 안정화제 등을 한 튜브에 넣고 상기 실시예 1에서 합성한 말라리아 주형 DNA, 말라리아 검출용 프라이머와 탐침 및 증류수를 넣어 총 용량이 50 μ l이 되도록 혼합한 후 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이 때, 총 용량 50 μ l 혼합액에 포함된 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 탐침의 농도는 각각 15pmole을 사용하였다. 이를 95°C에서 10분간 변성시킨 후, 95°C에서 20초, 55°C에서 30초씩 45 사이클을 반응시켰다. 증폭된 형광값은 각 PCR 사이클이 진행됨에 따라 55°C 30초 반응 후에 1회씩 지속적으로 측정되었다. 반응결과 PCR 효율이 좋은 세트 Tm 55°C 9 세트(표 3), Tm 65°C 2 세트(표 4)를 선택하였고, 상기 프라이머 및 탐침 중 PCR 증폭효율이 가장 높은 것은 서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 6의 역방향 프라이머, 서열번호 11의 정방향 탐침인 것을 알 수 있었다(도 2 내지 도 12).
- [132] 또한, 상기 실시예 1에서 합성한 내부 대조군용 DNA 및 내부 대조군용 모든 프라이머와 탐침을 세트로 조합한 후 상기와 같은 방법으로 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 진행하였다.
- [133] 반응 조건은 95°C에서 10분간 변성 후, 95°C에서 20초, 55°C에서 30초씩 45 사이클을 반응시켰다. 그 결과, PCR 증폭이 효율적으로 확인되는 내부 대조군용의 프라이머 및 탐침을 선택하였고(표 5), 상기 프라이머 및 탐침 중 PCR 증폭효율이 가장 높은 것은 서열번호 16의 정방향 프라이머, 서열번호 19의 역방향 프라이머, 서열번호 22의 정방향 탐침인 것을 알 수 있었다(도 13).
- [134] 이 후 실험에서는 말라리아 프라이머 및 탐침 중 PCR 증폭효율이 가장 높은 것(서열번호 1의 정방향 프라이머, 서열번호 6의 역방향 프라이머, 서열번호 11의 정방향 탐침)과 내부 대조군용 프라이머 및 탐침 중 결과가 가장 좋은 것(서열번호 16의 정방향 프라이머, 서열번호 19의 역방향 프라이머, 서열번호 22의 정방향 탐침)을 사용하였다.
- [135] 표 1

번호	Forward primer(정방향)	번호	Reverse Primer(역방향)	번호	TaqMan Probe(정방향)
1	GGTATTGGCCTAA CATGGCTATG	6	CCTGCTGCCTTCCT TAGATGTG	11	AGTTCGATTCCGGA GAGGGAGCCT
2	AACATGGCTATG ACGGGTAACG	7	CGCCTGCTGCCTTC CTTAG	12	CGATTCCGGAGAG GGAGCCTGA
3	TGAGAAATCAAA GTCTTTGGGTTCT	8	GAGTCAAATTAAG CCGCAAGCT	13	AGAATTGACGGAA GGGCACCACCAG
4	GCTATGACGGGT AACGGGGAA	9	GGGTAATTTACGC GCCTGCT	14	AGTTCGATTCCGGA GAGGGAGCCTGAG A
5	CAATTGGAGGGC AAGTCTGGTG	10	ACTACGAGCGTTTT AACTGCAACA	15	AGCAGCCGCGGTA ATTCCAGCTCCA

[136] 표 2

번호	Forward primer(정방향)	번호	Reverse Primer(역방향)	번호	TaqMan Probe(정방향)
16	ACGCACCAGCTCT TCCTCACT	19	CGCGGACAATGGC ACTCAT	22	CAGCTCAGTGCCTG GCGCCC
17	AGCCGGGCGACA TGTTG	20	GACACGATCTCCC GAAGCA	23	CAACTTTGAGAACA TGAGCAATGACGA CG
18	GCACCTCCTCTCG GCTAGTTC	21	AGGAGGATGCCCCG GTCTGT	24	ACAGACCGGGCAT CCTCCT

[137] 표 3

		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5	Test6	Test7	Test8	Test9
서열 번호	정방향	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	역방향	6	7	8	6	7	8	6	7	8
	탐침	11	11	11	12	12	12	13	13	13

[138] 표 4

		Test10	Test11
서열번호	정방향	4	5
	역방향	9	10
	탐침	14	15

[139] 표 5

		Test1	Test2	Test3	Test4	Test5	Test6	Test7	Test8
서열 번호	정방향	16	17	18	17	18	16	17	18
	역방향	19	20	21	20	21	19	20	21
	탐침	22	22	22	23	23	24	24	24

[140]

[141] 실시에 3. 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

[142] 상기 실시에 1에서 제작한 말라리아 DNA 및 내부 대조균용 DNA를 주형으로 하고, 상기 실시에 2에서 선택된 서열번호 1, 6, 및 11로 기재되는 말라리아 프라이머 및 탐침, 또한 서열번호 16, 19 및 22로 기재되는 내부 대조균용 프라이머 및 탐침을 적용하여 Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국), 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems사제, 미국) 및 iQ™5 Real-Time PCR Detection System (BioRad사제, 미국)을 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실행하여 성능을 비교하였다. 음성 대조균(말라리아 DNA 주형이 없는 공시료)을 함께 반응시켰다는 점 이외에는 실시에 2와 동일한 조건 및 성분으로 45 사이클의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

[143] 그 결과, 실시에 1의 방법대로 카피 수를 계산하여 말라리아 주형 DNA는 최저 10 카피까지 검출이 가능하였고(도 14, 16, 18), 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 표준 그래프를 작성했을 때, 기울기는 -3.01~3.65, R² 값은 0.9990~1.0000이었다(도 15, 17, 19). 여기서, R²는 실시간 중합효소연쇄반응의 표준 그래프를 그렸을 때 그래프의 직선성을 나타내는 상관계수로 1에 가까울수록(직선에 가까울수록), PCR이 제대로 진행되었음을 의미한다. 또한, 10⁵ 카피의 내부 대조균용 DNA를 함께 반응시켰음에도 말라리아 DNA 주형의 증폭에 아무런 영향을 주지 않고 내부 대조균 증폭이 독립적으로 이루어짐을 확인하였다.

[144]

[145] 실시에 4. 건조 타입 PCR 조성물을 사용한 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

[146] PCR 혼합액(프리믹스) 건조물에 대한 열안정성 검토를 위하여 상기 실시에 2와 같은 조성의 PCR 혼합액을 제조, 건조한 후 이를 사용하여 Exicycler™

Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)로 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실행하였다.

- [147] 구체적으로 10X Buffer 5 μ l, wTfi polymerase 2.5U, dNTP 20mM 5 μ l, Thermostable Pyrophosphatase, PPi, 안정화제 등을 한 튜브에 넣고 증류수를 넣어 총 용량이 25 μ l이 되도록 혼합한 후 96-웰 플레이트에 분주하고, SuperCentra2(바이오니아사제, 한국)를 이용하여 50~60분간 건조하였다. 이 후 상기 실시예 2에서 선택된 서열번호 1, 6 및 11로 기재되는 말라리아 프라이머 및 탐침, 또한 서열번호 16, 19 및 22로 기재되는 내부 대조군용 프라이머 및 탐침을 총 용량 5 μ l이 되도록 혼합한 후 1차 건조물에 추가 분주하여 25~30분 건조하였다.
- [148] 건조한 PCR 혼합물에 상기 실시예 1에서 제작한 말라리아 DNA 및 내부 대조군용 DNA를 주형으로 첨가하고, 수증기로 총 용량이 50 μ l가 되도록 분주하여 건조물이 잘 폴리도록 완전 혼합하였다. Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)을 이용하고 음성 대조군(말라리아 DNA 주형이 없는 공시료)을 함께 반응시켰다는 점 이외에는 실시예 2와 동일한 조건 및 성분으로 45 사이클의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [149] 그 결과, 실시예 1의 방법대로 카피 수를 계산하여 말라리아 주형 DNA는 최저 10 카피까지 검출이 가능하였고(도 20), 표준 주형 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응의 표준 그래프를 작성했을 때, 기울기는 -3.00, R² 값은 0.9995이었다(도 21). 여기서, R²는 실시간 중합효소 연쇄반응의 표준 그래프를 그렸을 때 그래프의 직선성을 나타내는 상관계수로 1에 가까울수록(직선에 가까울수록), PCR이 제대로 진행되었음을 의미한다.
- [150] 상기 결과에 의해 용액 상태의 PCR 혼합액을 사용한 것과 건조한 혼합물을 사용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 두 가지 방법에서 동등한 성능이 유지됨을 알 수 있다.
- [151] 상기 방법과 동일하게 건조한 PCR 혼합물을 사용하여 최종적으로 다이내믹 레인지(Dynamic Range, 한번의 반응에서 검출할 수 있는 말라리아 DNA의 농도 범위) 확인을 위해 Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)을 이용하여 실시예 2와 동일한 조건으로 45 사이클의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 실시예 1의 방법대로 카피 수를 계산한 말라리아 주형 DNA를 최고 10¹⁰ 카피에서 최저 10 카피 농도 범위에서 10배씩 희석하여 사용하였으며, 10 log 범위에서 말라리아 DNA 검출이 정상적으로 이루어짐을 확인하였다(도 22).
- [152]
- [153] 실시예 5. 건조 타입 PCR 조성물의 보관 기간에 따른 안정성 시험
- [154] 상기 실시예 4와 동일한 조성과 방법을 이용하여 서열번호 1, 6 및 11로 기재되는 말라리아 프라이머 및 탐침과 서열번호 16, 19 및 22로 기재되는 내부 대조군용 프라이머 및 탐침을 포함하는 건조 상태의 PCR 혼합물을 제조한 뒤,

40°C에서 1일 간격으로 8일 동안 정온 배치하고, 각 보관 기간별 건조 타입 PCR 조성물을 Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)을 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 조건으로 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이는 실제 보관 권장 온도인 -20°C에서 건조 PCR 조성물의 성능 유지 기간을 가속화 실험을 통해 단기간에 예측할 수 있는 방법으로, 40°C에서 1일 보관한 경우 -20°C에서 약 64일 보관한 것으로 간주한다(표 6).

[155] 구체적으로, 건조 타입 PCR 조성물은 동일 배치(batch)로 9일 분량을 한번에 제조한 후, 건조 직후의 혼합물 일부를 실시예 2와 동일한 조건으로 45 사이클의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응에 사용하여 대조군 결과를 얻었다. 그 외의 건조 타입 PCR 조성물은 모두 40°C 항온기에 동시에 넣어두었으며, 반응에 필요한 수량만큼 하루 간격으로 꺼내어 각각 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이 때, 말라리아 주형 DNA는 실시예 1의 방법대로 카피 수를 계산하였고, 최고 10^7 부터 최저 10^3 카피까지 5가지 농도를 사용하여 반응을 진행하였다. Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)을 이용하여 얻은 각 보관 일수별 건조 혼합물의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 결과 중 기울기 값과 R^2 값을 대조군 결과와 비교하여, 제조 직후의 건조 혼합물과 40°C 보관 일수에 따른 건조 혼합물의 성능을 비교하였다.

[156] 40°C에서 1일 간격으로 8일 동안 정온배치하여 실험한 결과, 액체 상태의 PCR 혼합물인 대조군에서 기울기는 -2.95, R^2 값은 0.9999(도 23)이었으며, 40°C에서 보관한 건조 타입 PCR 조성물은 기울기 -2.78~-3.05, R^2 값은 0.9989~0.9999로 확인되었다(도 24 내지 도 31). 이는 40°C 정온배치 8일 후에도 건조 직후의 결과와 동등 수준의 결과값을 얻은 것으로, -20°C 보관일수로 환산하면 약 512일 동안 건조 직후와 거의 유사한 결과를 안정되게 얻을 수 있음을 의미한다.

[157] 표 6

10°C의 법칙 (가속인자 : 온도)

$$\theta_n = 2^a \times \theta_s$$

$$**a = (\text{가속화된 온도} - \text{정상온도})/10$$

N.Temp	0s	1day	2day	3day	4day	5day	6day	7day	8day	9day	10day	11day	12day	13day	14day	15day
(Room Temp.) 25°C		2.8	5.7	8.5	11.3	14.1	17.0	19.8	22.6	25.5	28.3	31.1	33.9	36.8	39.6	42.4
(refrigerated temp.) 4°C		12.1	24	36	48	61	72.8	84.9	97	1.9	121	133	146	158	170	182
(frozen temp.) -20°C		64	128	192	256	320	384	448	512	576	640	704	768	832	896	960

[158] N.Temp : Normal temperature 로 정상온도를 의미한다.

[159]

[160] 실시예 6. 건조 타입 PCR 조성물을 이용한 4종 말라리아 검체의 검출시험

[161] 상기 실시예 4에서 제작한 서열번호 1, 6 및 11로 기재되는 말라리아 프라이머 및 탐침과 서열번호 16, 19 및 22로 기재되는 내부 대조군용 프라이머 및 탐침을 포함하는 건조 타입 PCR 조성물을 이용하여 4종의 말라리아 검체에 대해 검출시험을 하였다. 환자 혈액 또는 배양액을 이용하여 말초혈액도말법(염색 및

현미경 관찰; Payne D. Bulletin of the WHO, 66: 621-6, 1988 참조)으로 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아 양성 또는 음성으로 판정된 검체와, 환자 객담을 이용하여 항산균 염색법(AFB smear; 고원중 외, 결핵 및 호흡기 질환, 54: 22-32, 2003 참조)에 의해 MTB(Mycobacterium tuberculosis) 양성으로 판정된 검체로부터 추출된 DNA를 Exicycler™ Quantitative Thermal Block을 이용하여 실시예 2와 같은 조건으로 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 진행하였다(도 32 내지 도 35).

[162] 구체적으로 100 μ l의 전혈(Whole Blood) 검체로부터 DNA를 추출하기 위해 QIAamp DNA blood kit(QIAGEN, 미국)을 이용하였고, Kit의 권장 실험방법에 따라 추출과정을 진행하여 최종적으로 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 1 mM EDTA) 200 μ l에 용리하여 사용시까지 -70°C에 냉동 보관하였다.

[163] 또한 환자 혈액 또는 배양액을 이용하여 말초혈액도말법 (염색 및 현미경 관찰)으로 열대열 말라리아, 삼일열 말라리아, 사일열 말라리아 및 난형 말라리아 양성으로 판정된 검체로부터 추출된 DNA를 Exicycler™ Quantitative Thermal Block을 이용하여 실시예 2와 같은 조건으로 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 진행하였다. 이는 본 발명의 프라이머 및 탐침을 상기 실시예 3의 표준 주형 뿐 아니라 실제 4종의 말라리아 양성 검체에 적용하였을 때에도 동일한 결과가 나오는지 확인하기 위함이며, 말라리아 음성 검체 및 무관한 병원균(Non-Related pathogen)에 대해서 교차반응 유무를 확인하기 위함이다(도 36).

[164] 그 결과, 상기의 4종 말라리아 양성검체에 대해 말라리아 유전자가 모두 증폭되었고, 교차반응 유무를 판단하기 위하여 말라리아 음성 검체 및 MTB 양성 검체로부터 DNA를 추출하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 진행한 경우에는 증폭이 되지 않음을 확인하였다. 이로써 본 발명의 프라이머 및 탐침은 4종의 말라리아 유전자를 동시에 검출할 수 있고, 무관한 병원균과 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다(도 37).

[165]

[166] 실시예 7. 건조 타입 PCR 조성물을 이용한 말라리아 검체의 검출 특이도(민감도) 시험

[167] 상기 실시예 4에서 제작한 건조 타입 PCR 혼합물을 이용하여 말라리아 검체에 대해 검출시험을 수행하였다. 상기 검체는 환자 혈액 또는 배양액을 이용하여 말초혈액도말법(염색 및 현미경 관찰)으로 양성 또는 음성으로 판정된 99개의 검체로써, 2개의 열대열 말라리아 양성 검체, 82개의 삼일열 말라리아 양성 검체, 15개의 말라리아 음성 검체로부터 추출된 DNA를 포함한다. 상기 말라리아 검체는 QIAamp DNA blood kit(QIAGEN, 미국)을 이용하여 100 μ l의 전혈로부터 DNA를 추출하였고, Kit의 권장 실험방법에 따라 추출과정을 진행하여 최종적으로 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0 및 1 mM EDTA) 200 μ l에 용리하여 -70°C에 냉동 보관 후 시험에 사용하였다.

- [168] 구체적으로는, 실시예 4에서 제작한 서열번호 1, 6 및 11로 기재되는 말라리아 프라이머 및 탐침과 서열번호 16, 19 및 22로 기재되는 내부 대조균용 프라이머 및 탐침을 포함하는 건조 타입 PCR 조성물에 상기 실시예 1에서 제작한 말라리아 DNA 및 내부 대조균용 DNA를 주형으로 첨가하고, 수증기로 총 용량이 50 μ l가 되도록 분주하여 건조 조성물이 잘 풀리도록 완전 혼합하였다. 이때, 말라리아 주형 DNA는 실시예 1의 방법과 같이 카피 수를 계산하여 최대 10⁷ 카피~최소 10카피를 농도별로 첨가하여 양성 검체의 정량적 분석이 가능하도록 하였으며, 검체 시험을 위해서는 상기와 동일한 성분에 주형 DNA를 제외하고 각각의 검체로부터 추출한 DNA를 대체 첨가하였다. Exicycler™ Quantitative Thermal Block(바이오니아사제, 한국)을 이용하여 상기 실시예 2와 동일한 조건으로 45 사이클의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.
- [169] 그 결과, 99개의 모든 말라리아 검체에서 현미경 관찰시험 결과와 100% 일치하는 양성 또는 음성의 결과를 얻었다. 즉, 2개의 열대열 말라리아 양성 검체, 82개의 삼일열 말라리아 양성 검체를 포함하는 84개의 검체에서 말라리아 DNA가 검출되었으며, 15개의 말라리아 음성 검체에서는 DNA가 전혀 검출되지 않았다(표 7).
- [170] 이로써 현미경 관찰시험의 음성, 양성 판정 결과를 기준으로 하여, 본 발명에서 제공되는 건조 타입의 PCR 조성물이 100%의 민감도(특이도)를 가짐을 확인하였다.

[171] 표 7

	양성 샘플		음성 샘플
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	정상 혈청
현미경/병리학적 검사	2	82	15
본 발명의 건조 타입의 PCR 조성물	2	82	15

[172]

[173] 실시예 8. 건조 타입 PCR 조성물을 이용한 말라리아 검체의 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응 및 현미경 관찰시험과의 분포 비교

[174] 실시예 7에서 사용한 말라리아 검체에 대하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응을 통해 얻은 결과값과 말초혈액도말법(염색 및 현미경 관찰)으로 결정된 말라리아 원충 수(Laserson KF et al, Am J Trop. Med. Hyg, 50:169-80, 1994 참조)의 두 가지 변수에 대해 윌콕슨 검정방법(Wilcoxon's test)을 수행하였다. 윌콕슨 검정방법은 짝을 이룬 관측값들의 분포에 서로 차이가 있는지를 검증하는 분석기법으로 정규분포 또는 연속형 척도(등간 및 비율척도)와 같은 짝을 이룬 표본이 t-test 요건을 충족하지 못하였을 때 이용할 수 있다. 따라서 윌콕슨 검정은 모집단의 분포가 정규분포일 필요도 없으며 최소한 연속적 서열 척도이면 분석이 가능하다. 즉, 말라리아 검체에 대한 실시간 역전사 중합효소

연쇄 반응의 Ct 값 순위를 분석하고, 동일 검체에 대하여 현미경 관찰 시험으로 얻은 기생충 수의 순위를 분석한 후 월콕슨 검정방법을 적용하여 두 값의 분포 양상을 비교하였다. 이는 두 개의 독립적인 말라리아 검출 방법을 통해 얻은 결과 수치에 대해 분포의 동일성을 확인하기 위함이며, SPSS 14.0v 프로그램을 사용하여 분석하였다(SPSS Inc. 미국).

- [175] 상기 분석방법을 통하여 r값은 -0.320, Pearson's correlation coefficient 계산 방법에 따라 구한 P값은 0.01의 값으로 확인되었으며, 이때 r값은 두 검출 방법 사이의 상관성, P값은 유의성을 판단하는 기준이 된다. 즉, -0.320의 r값은 두 검출 방법이 음의 상관관계를 가지고 있음을 말하는 것으로, 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 얻은 Ct 값이 작을수록 현미경 관찰 시험으로 얻은 말라리아 원충 수는 큰 값을 가짐을 의미한다. 또한 P값은 유의성을 판단하는 기준으로 0.05이하로 나왔을 때 분석한 두 방법 사이에 유의관계가 성립한다. 상기 분석 결과 0.01의 P값을 가지므로 높은 유의수준을 가진다고 볼 수 있다(도 38).

청구범위

- [청구항 1] 삼일열 말라리아 원충 18S 리보솜 RNA 유전자의 350 내지 1180 번째 염기 내의 5 내지 40 개의 염기서열로 구성되는 말라리아 검출용 프라이머.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 서열번호 1 내지 10으로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 프라이머.
- [청구항 3] 삼일열 말라리아 원충 18S 리보솜 RNA 유전자의 350 내지 1180 염기 내의 5 내지 40 개의 염기서열로 구성되는 말라리아 검출용 탐침.
- [청구항 4] 청구항 4에 있어서, 서열번호 11 내지 15로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 탐침.
- [청구항 5] 청구항 3 또는 청구항 4에 있어서, 리포터와 소광제가 붙어 있는 구조인 탐침.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서, 상기 리포터는 FAM인 탐침.
- [청구항 7] 청구항 5에 있어서, 상기 소광제는 BHQ1인 탐침.
- [청구항 8] 청구항 1의 말라리아 검출용 프라이머 및 청구항 3의 말라리아 검출용 탐침을 포함하는 말라리아 검출용 키트.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서, 상기 말라리아 검출용 키트는 내부 대조군용 유전자, 프라이머 및 탐침을 더 포함하는 말라리아 검출용 키트.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서, 상기 말라리아 검출용 키트는 건조 타입인 말라리아 검출용 키트.
- [청구항 11] 청구항 9에 있어서, 상기 내부 대조군용 유전자, 프라이머 및 탐침은 *Mus musculus* dishevelled, dsh homolog 1(*Drosophila*)(Dvl1) 유전자(GenBank, Accession No. NM010091)의 염기서열로부터 유래된 것인 말라리아 검출용 키트.
- [청구항 12] 청구항 11에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 16 내지 21로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 탐침은 서열번호 22 내지 24로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출용 키트.
- [청구항 13] 1) 검체를 주형으로 청구항 1의 말라리아 검출용 프라이머와

청구항 3의 말라리아 검출용 탐침을 사용하여 중합효소 연쇄반응 또는 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계; 및

2) 상기 1) 단계의 증폭 유무 또는 증폭 산물에 대한 형광값을 조사하는 단계를 포함하는 말라리아 검출방법.

[청구항 14]

청구항 13에 있어서,

상기 연쇄반응을 수행하는 단계는 내부 대조균용 유전자, 프라이머, 탐침을 추가로 사용하여 수행하는 말라리아 검출방법.

[청구항 15]

청구항 13에 있어서,

상기 내부 대조균용 유전자, 프라이머 및 탐침은 *Mus musculus* *dishevelled, dsh homolog 1*(*Drosophila*)(*Dvl1*) 유전자(GenBank. Accession No. NM010091)의 염기서열로부터 유래된 것인 말라리아 검출방법.

[청구항 16]

청구항 15에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 16 내지 21로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 탐침은 서열번호 22 내지 24로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택되는 말라리아 검출방법.

(A)

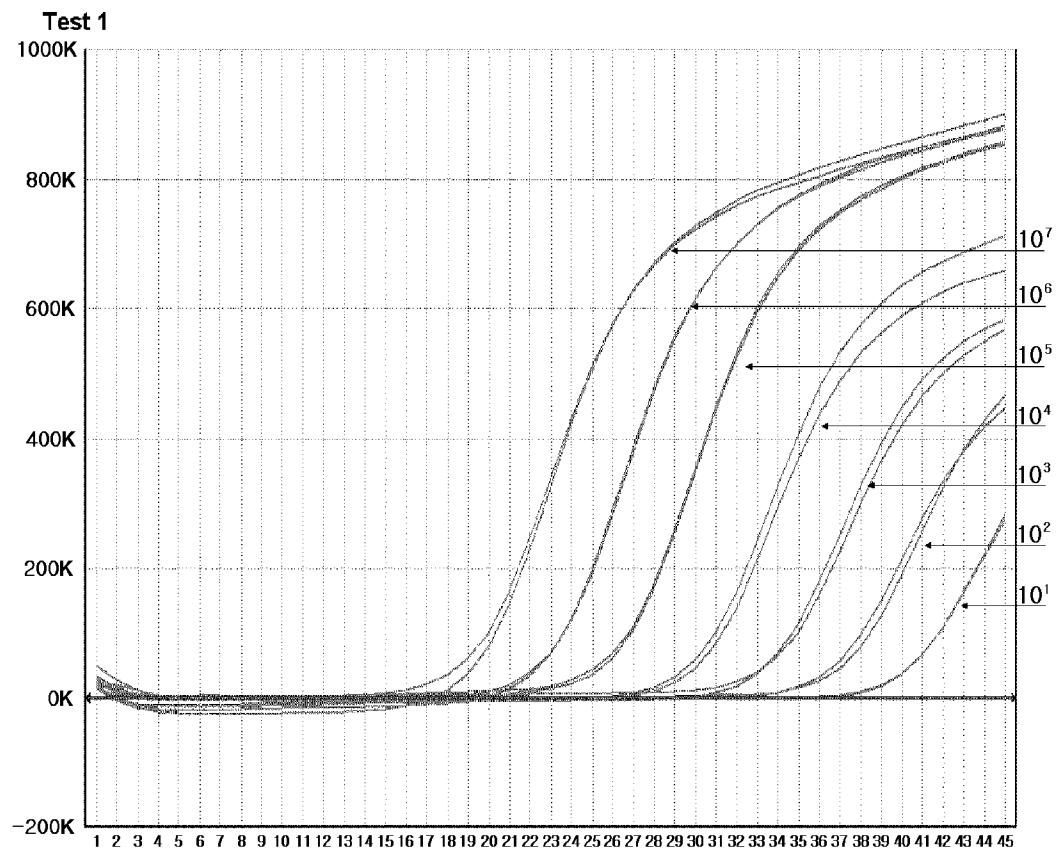
(B)

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470
n 1608423208 19172.1 FFA9BEA 1-2090	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 2350430216 19172.1 FFA9BEA 1-2092	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 32860833 Jasch J015927.1 1-2091	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 20851633 Jasch J015927.1 1-2090	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 4925710326 Jasch J015927.1 1-2091	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 4925710326 Jasch J015927.1 1-2092	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 4925710326 Jasch J015927.1 1-2094	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 10863033 Jasch J015927.1 1-2102	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 4925710326 Jasch J015927.1 1-2104	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 42258233 Jasch J015927.1 1-2094	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 6010333 Jasch J015927.1 1-2063	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 10630333 Jasch J015927.1 1-2147	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 60541733 Jasch J015927.1 1-2149	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		
n 142193833 Jasch J015927.1 1-2040	AACATGCGTATGACGGGTAA	CGGGAAATTAAGATTT	CGATTCCGGAGAGGGAGCG	CTGGA	AAATAGCTACCCACATCTA	AGGAAGCGACGACGG	CG	CGTAATATACCCAAATCTA	AAAG		

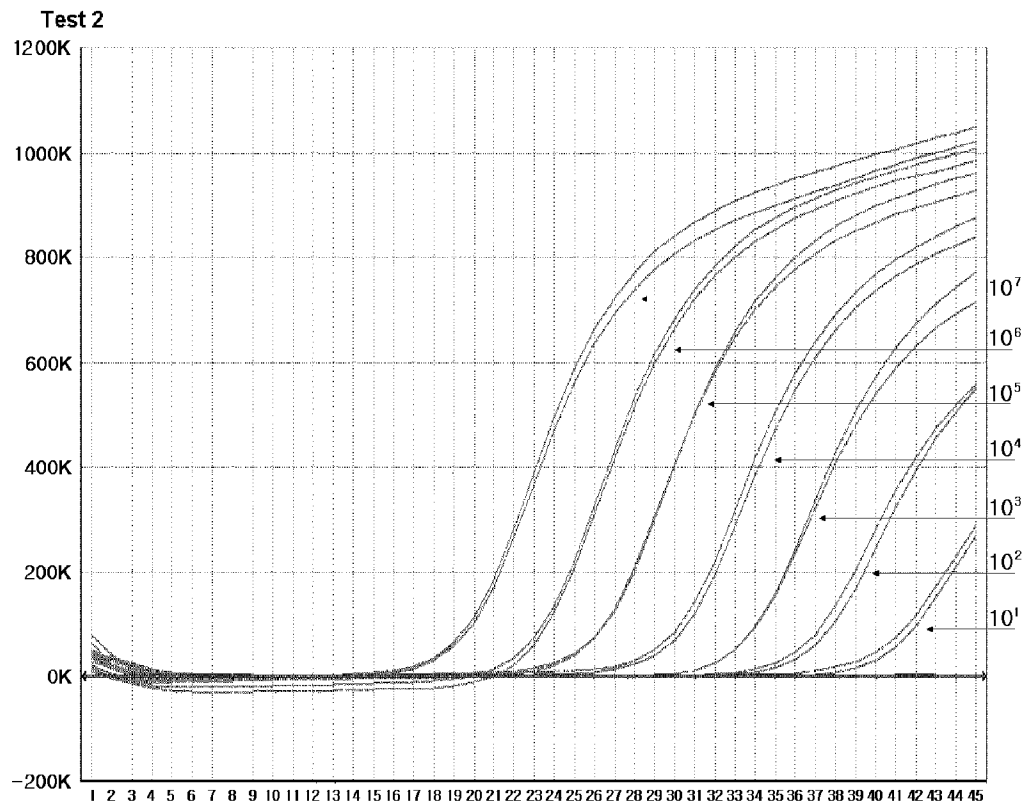
Consensus

AACATGGCTATGACGGGTAAACGGGGAATTAGAGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGETACCAATCTAAGGAAGGAGCAGGCGCGTAATTAACCAATTTAAAGA

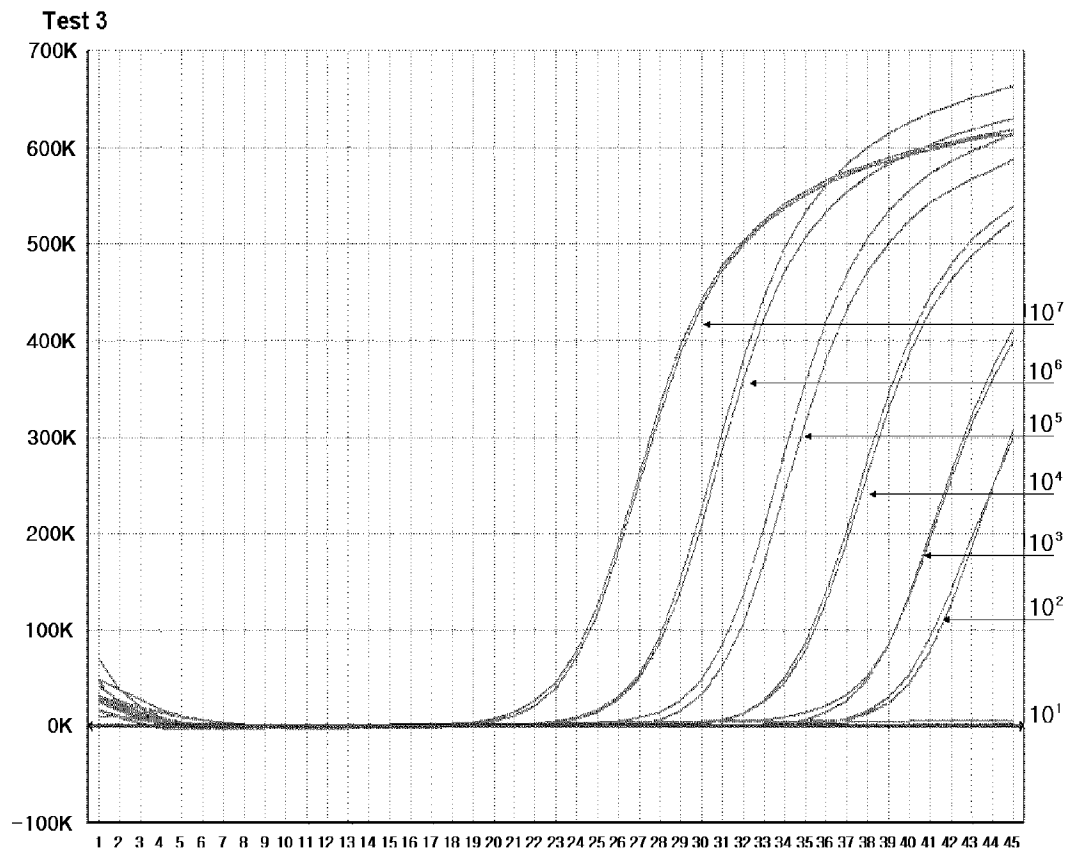
[Fig. 2]



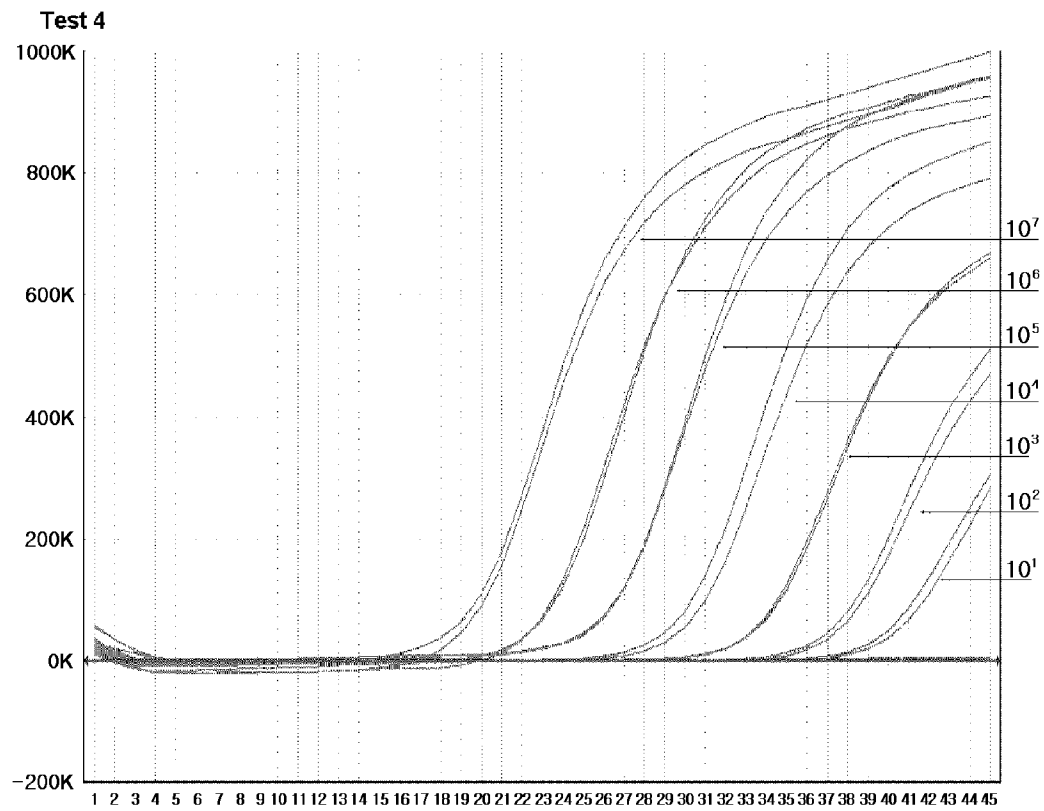
[Fig. 3]



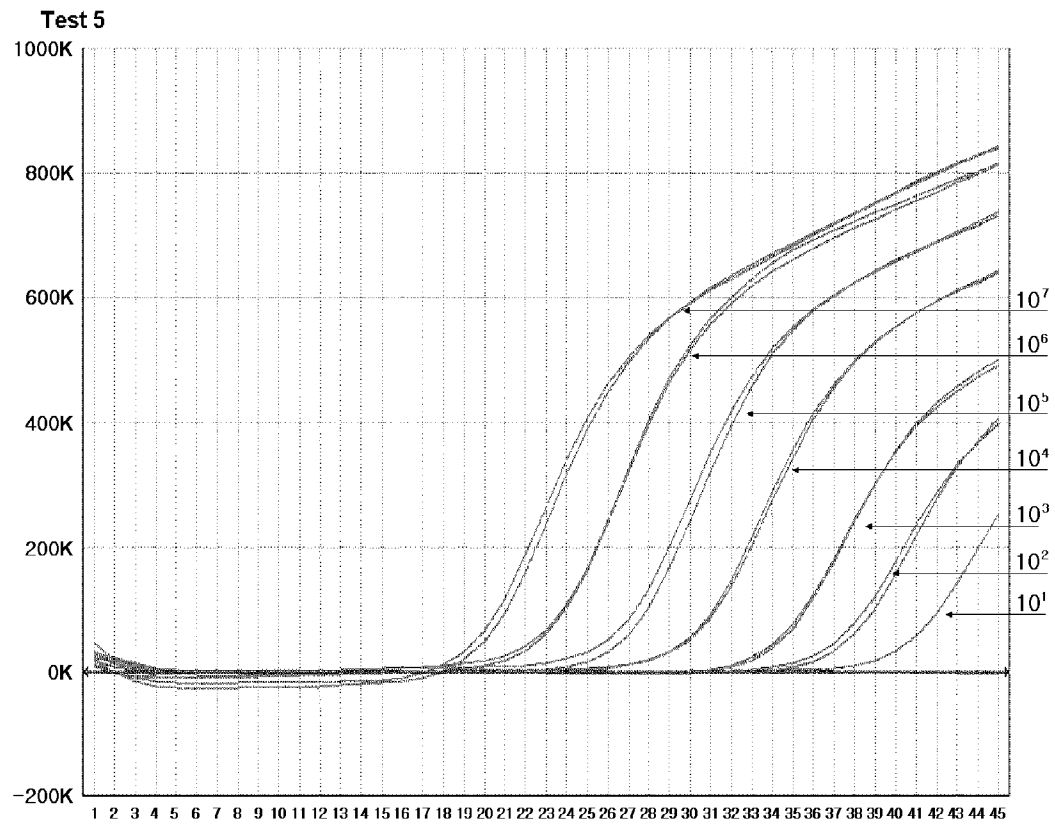
[Fig. 4]



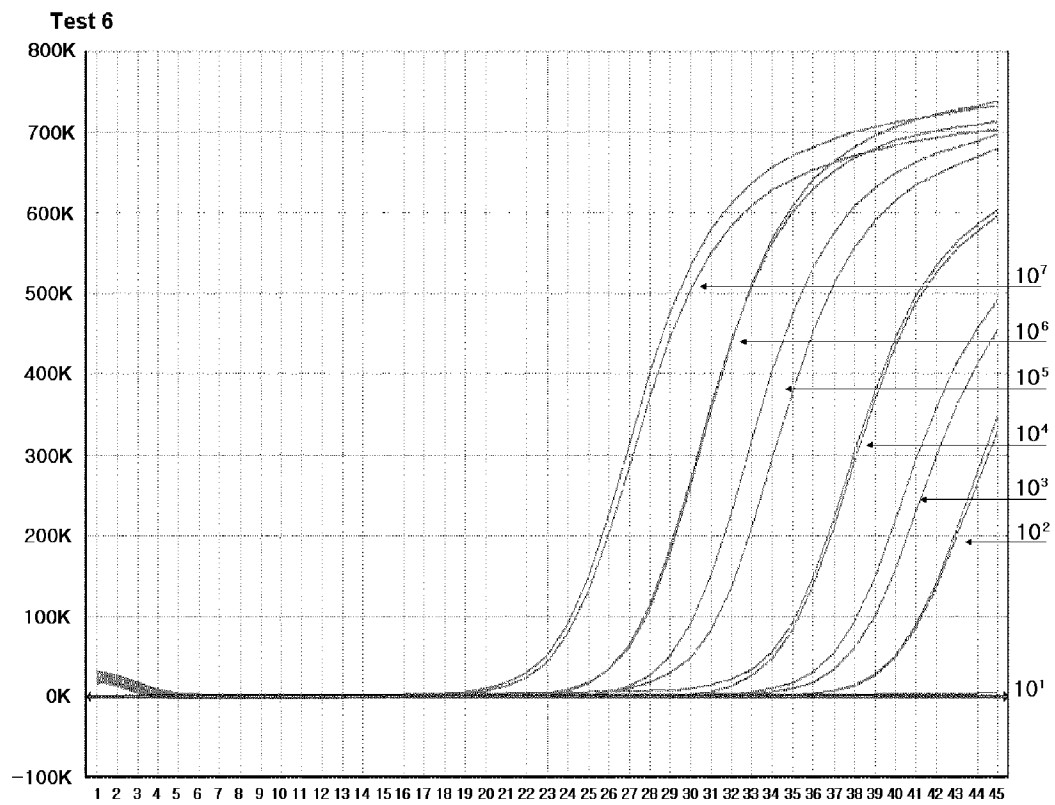
[Fig. 5]



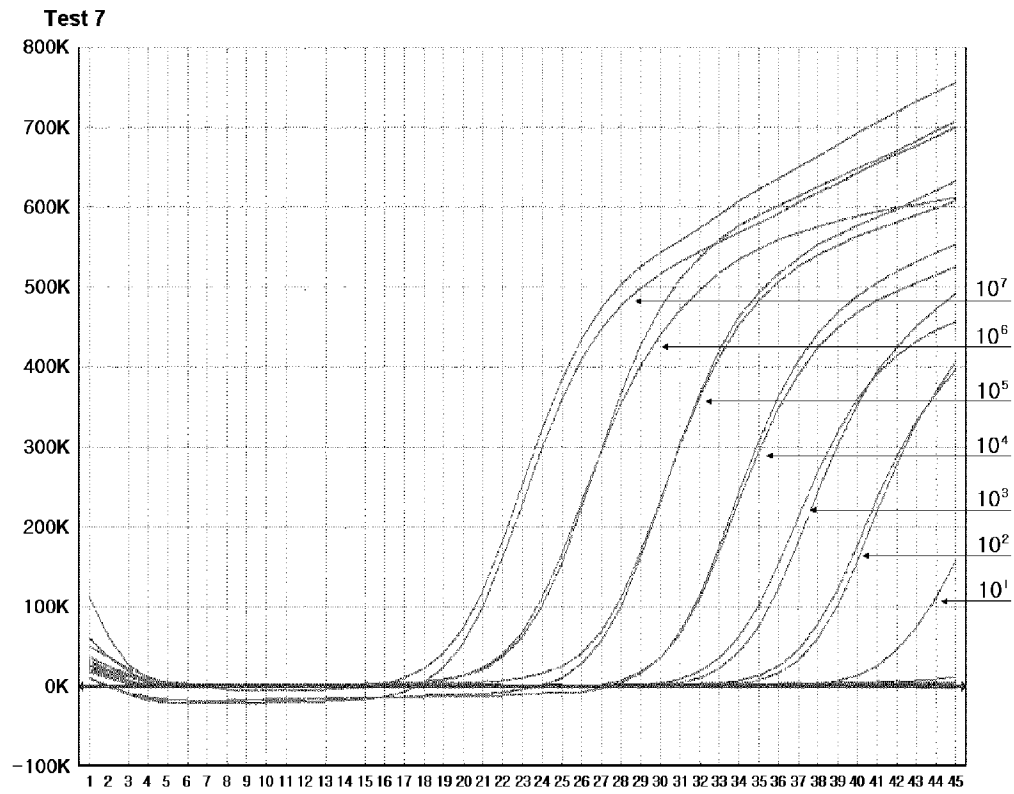
[Fig. 6]



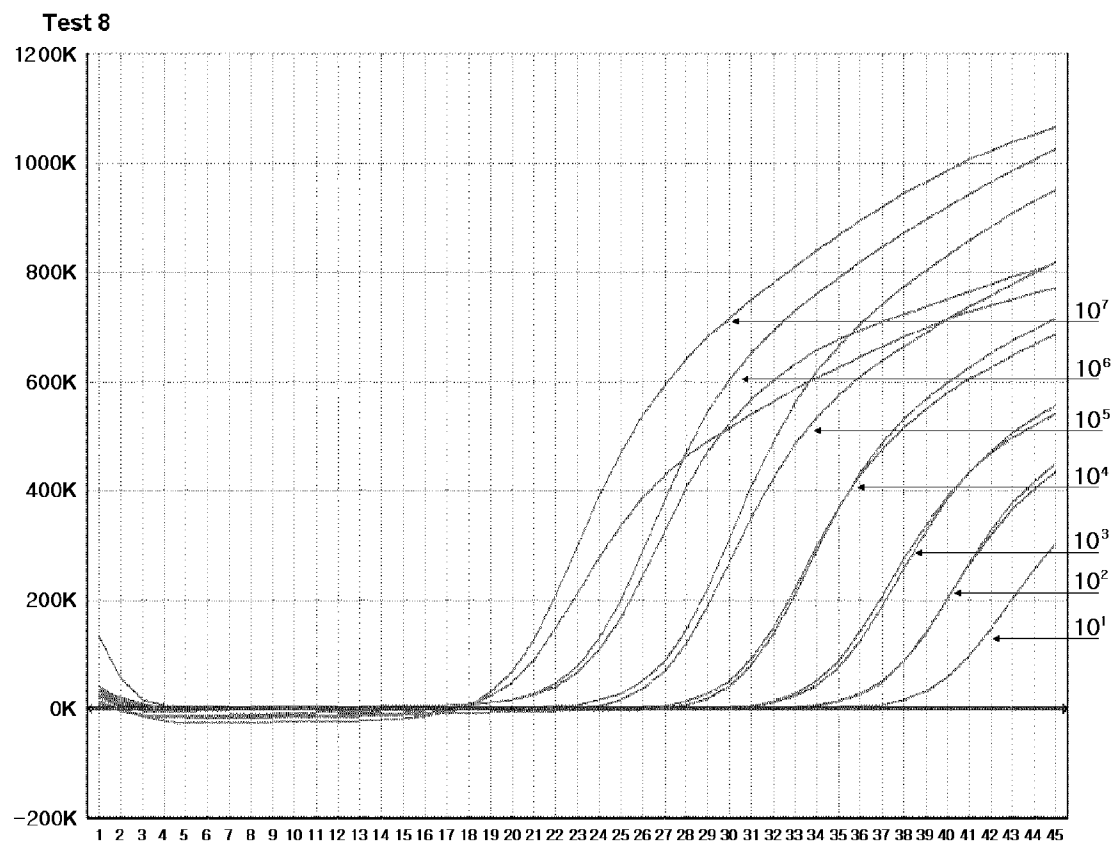
[Fig. 7]



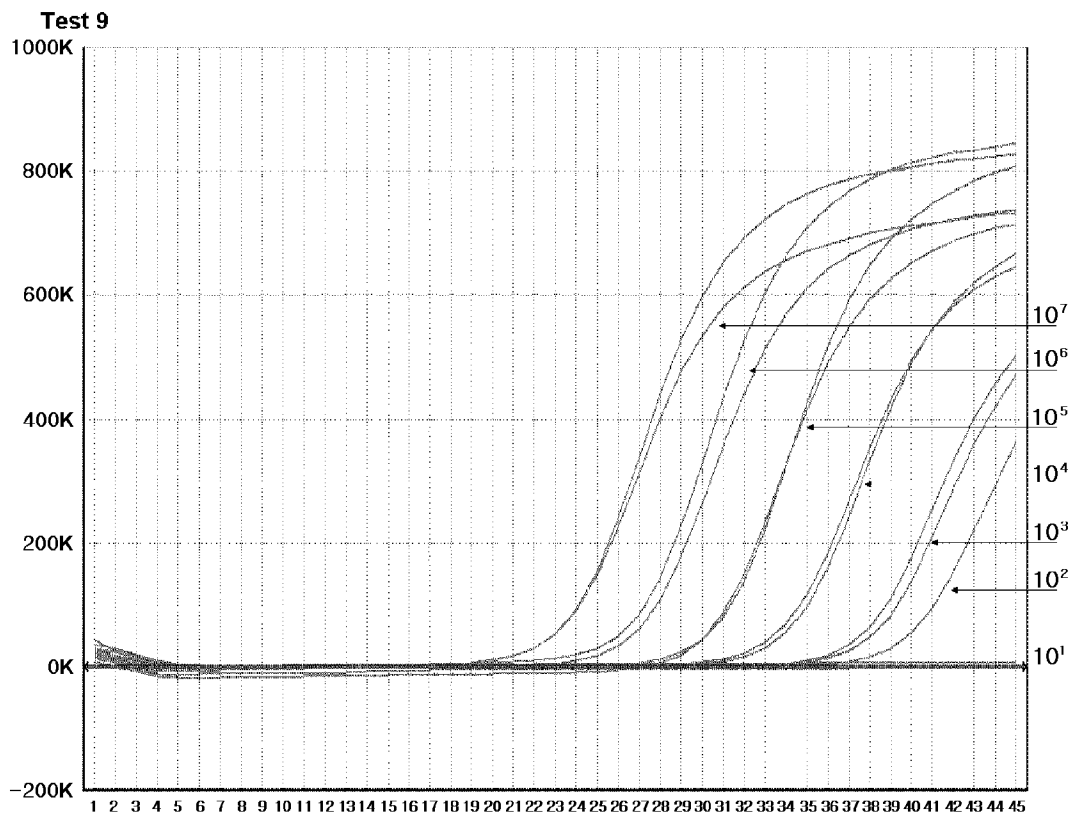
[Fig. 8]



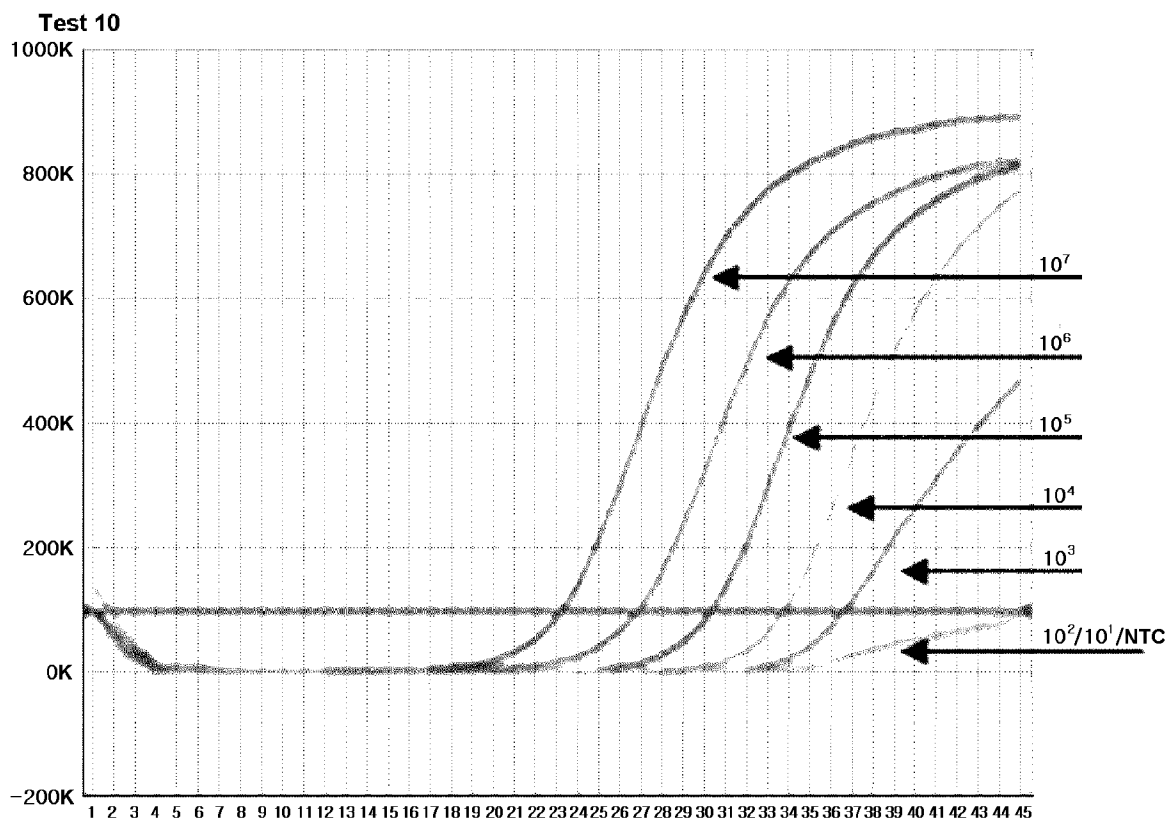
[Fig. 9]



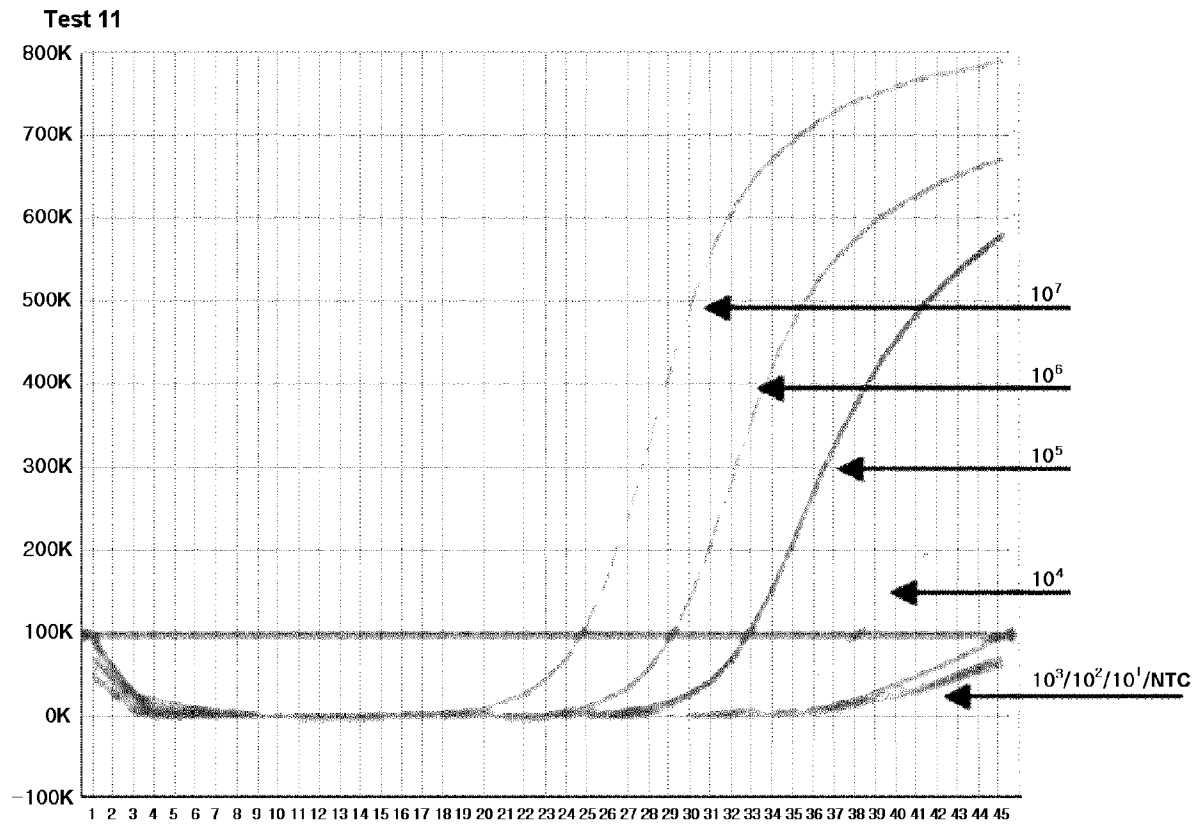
[Fig. 10]



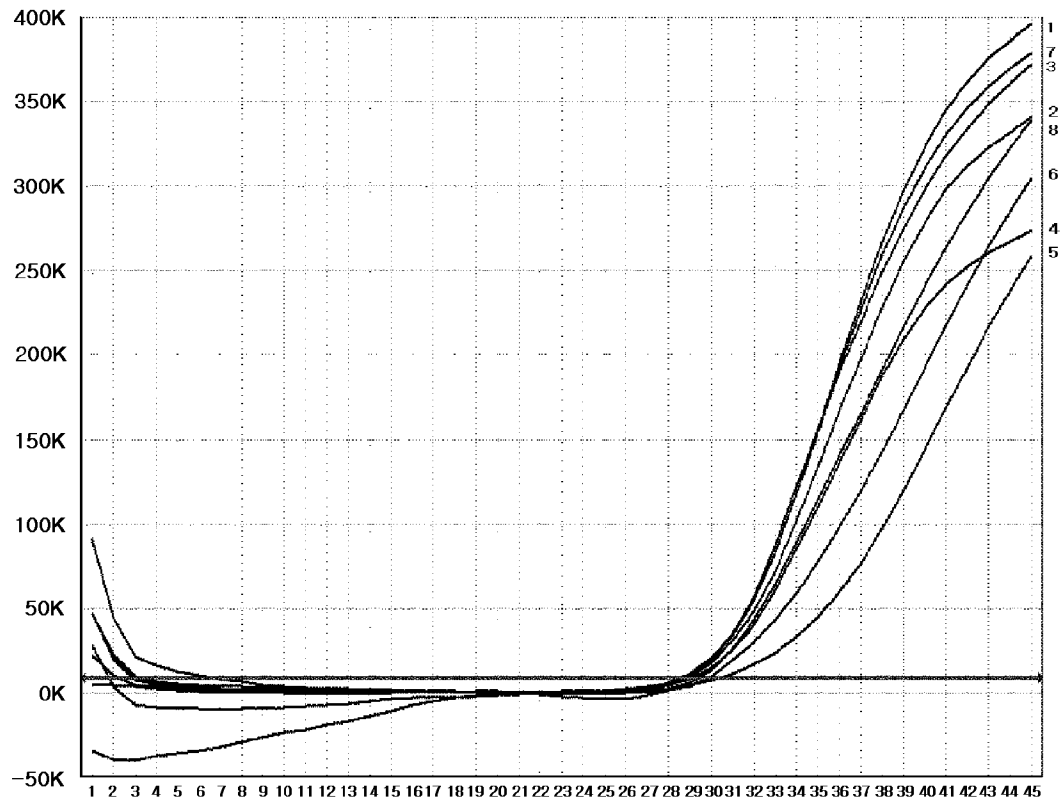
[Fig. 11]



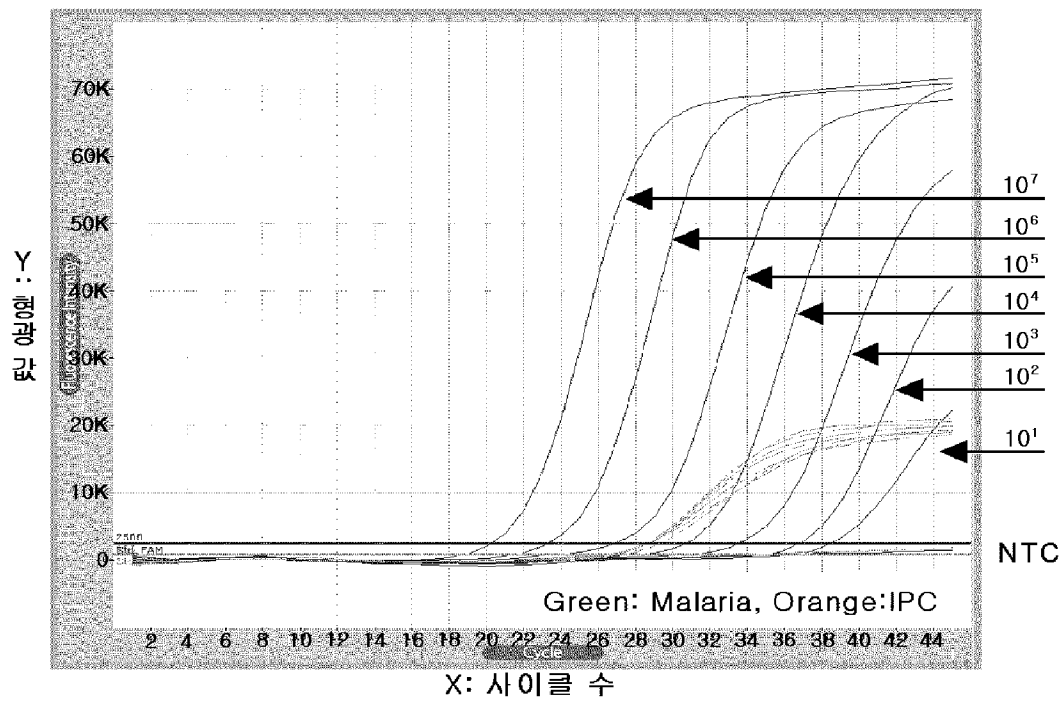
[Fig. 12]



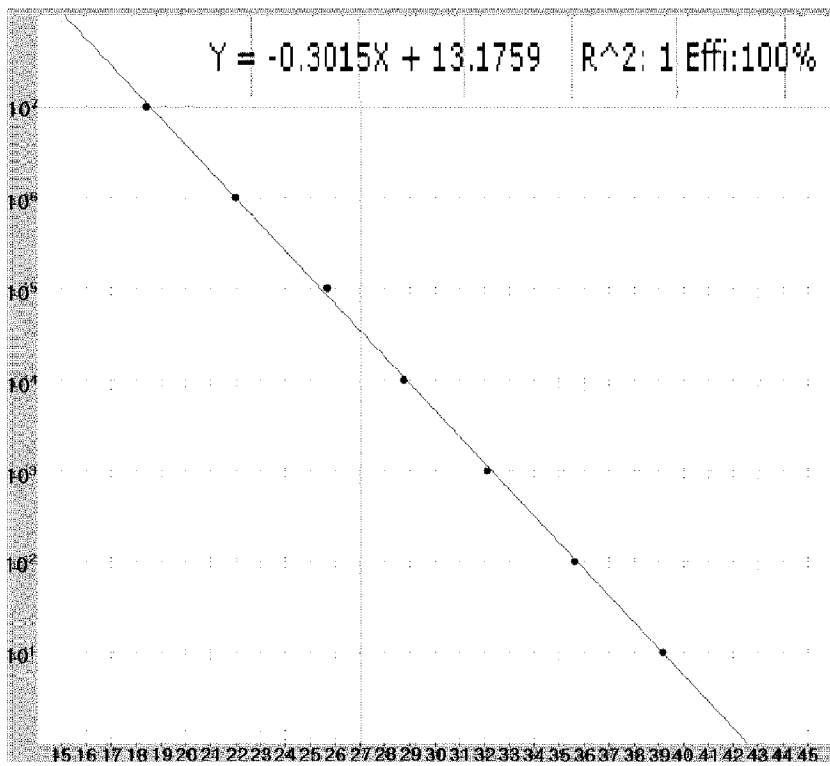
[Fig. 13]



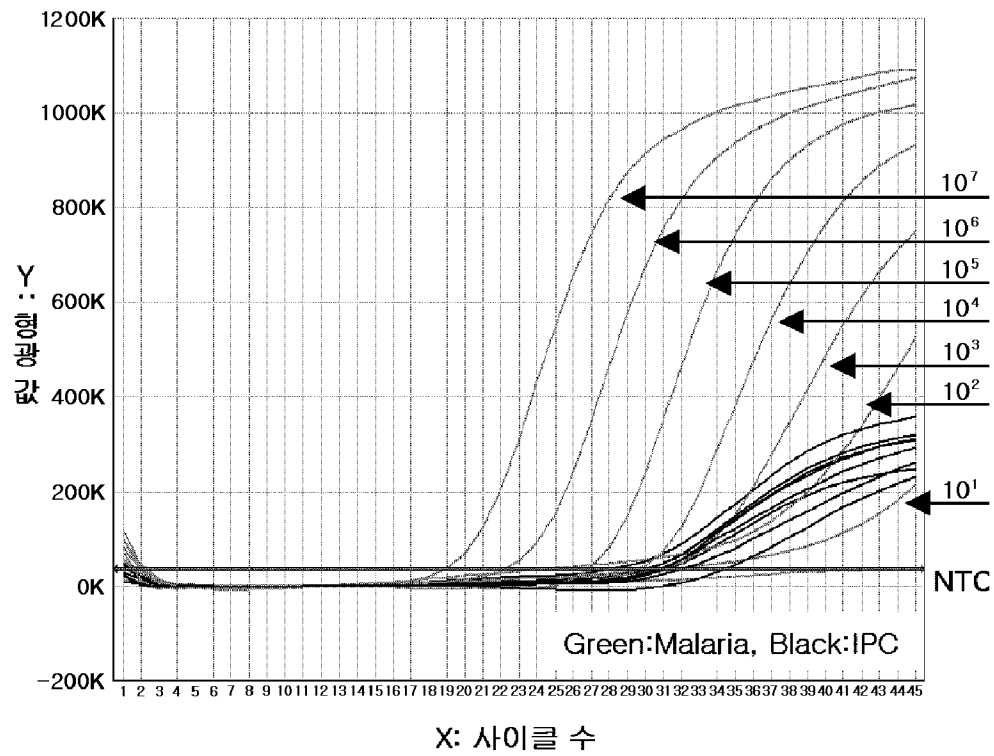
[Fig. 14]



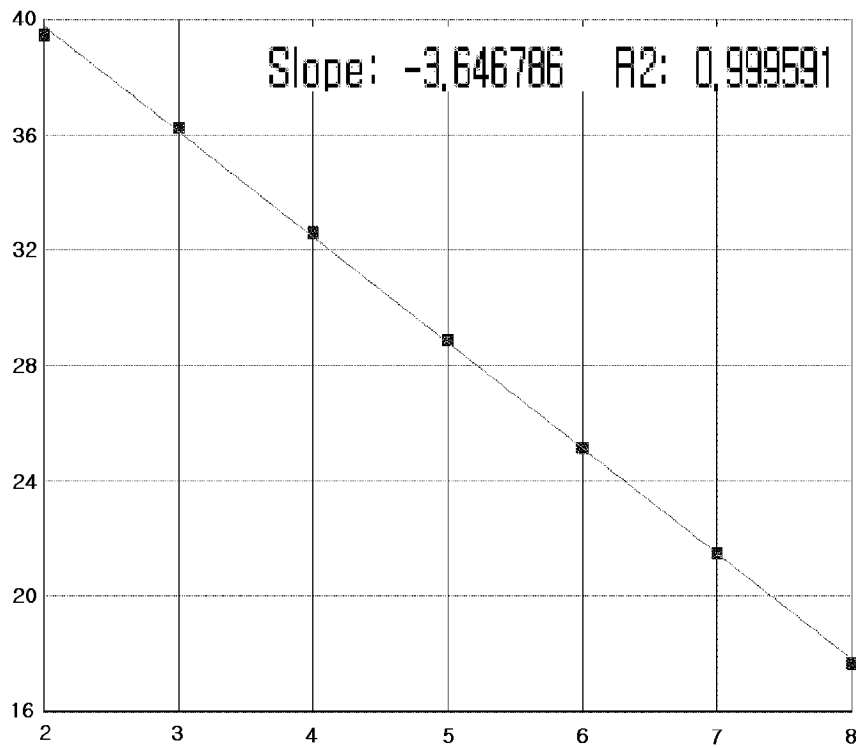
[Fig. 15]



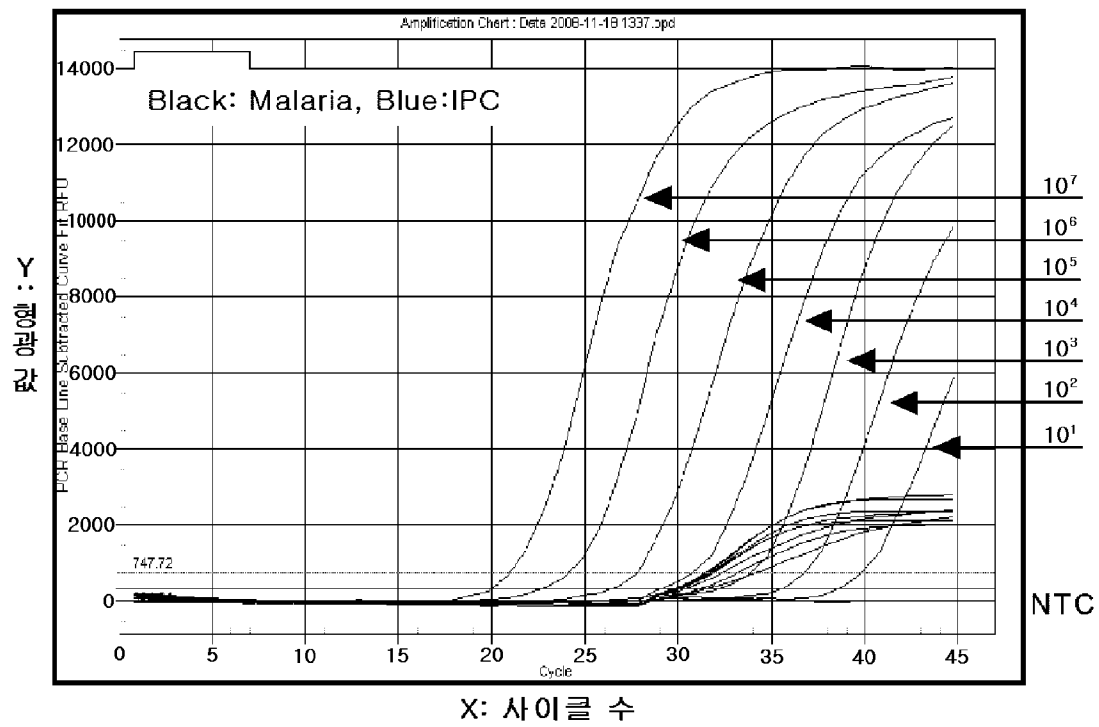
[Fig. 16]



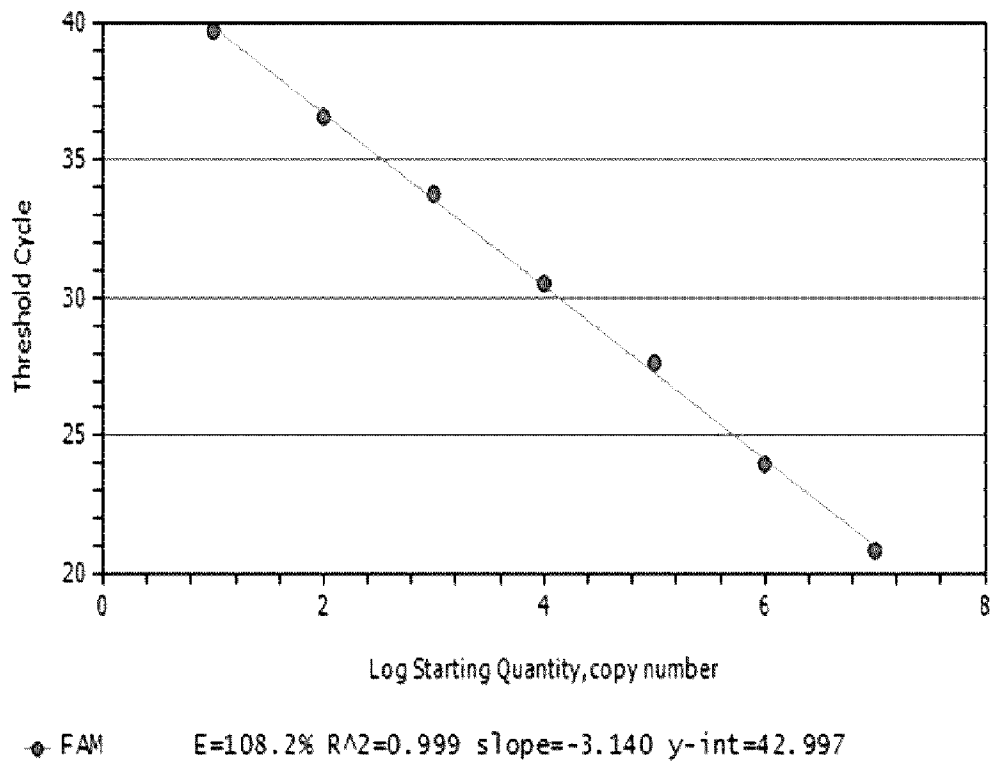
[Fig. 17]



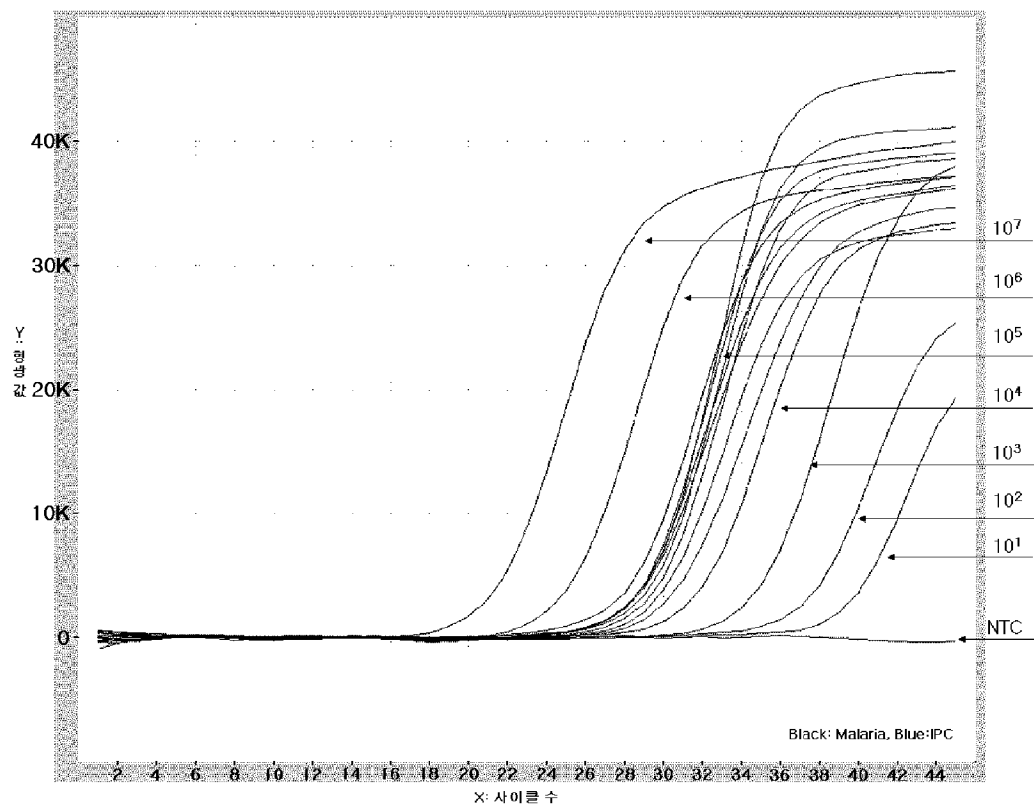
[Fig. 18]



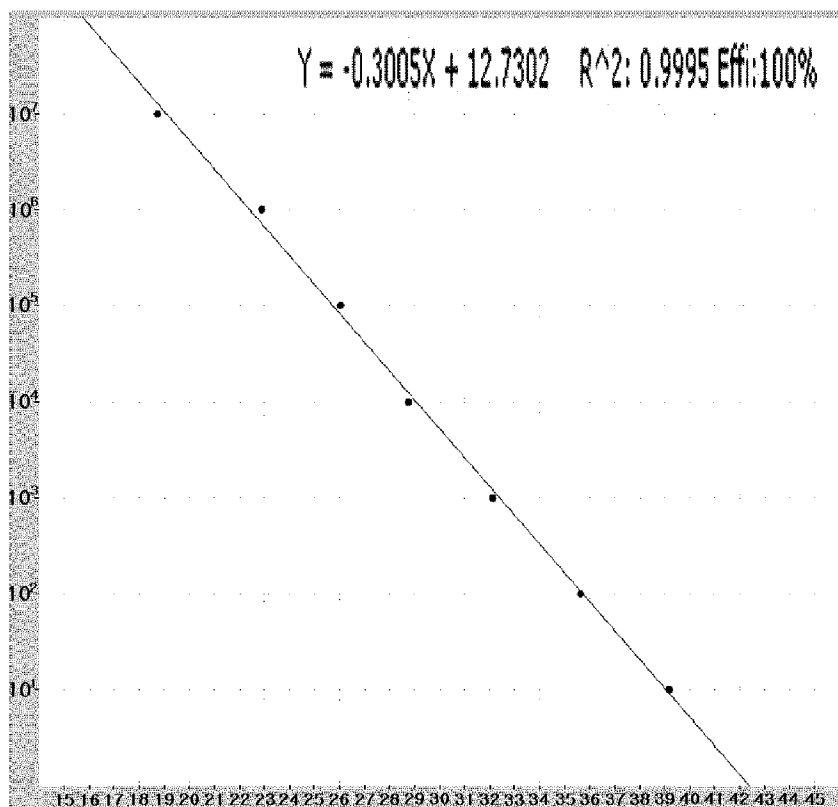
[Fig. 19]



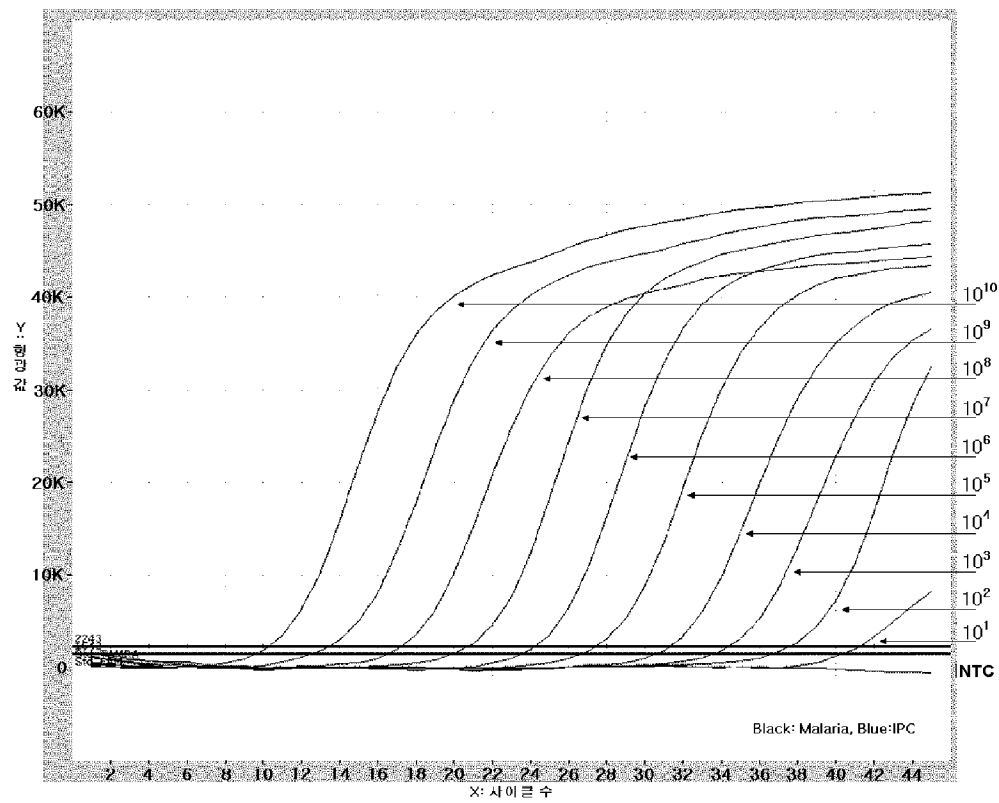
[Fig. 20]



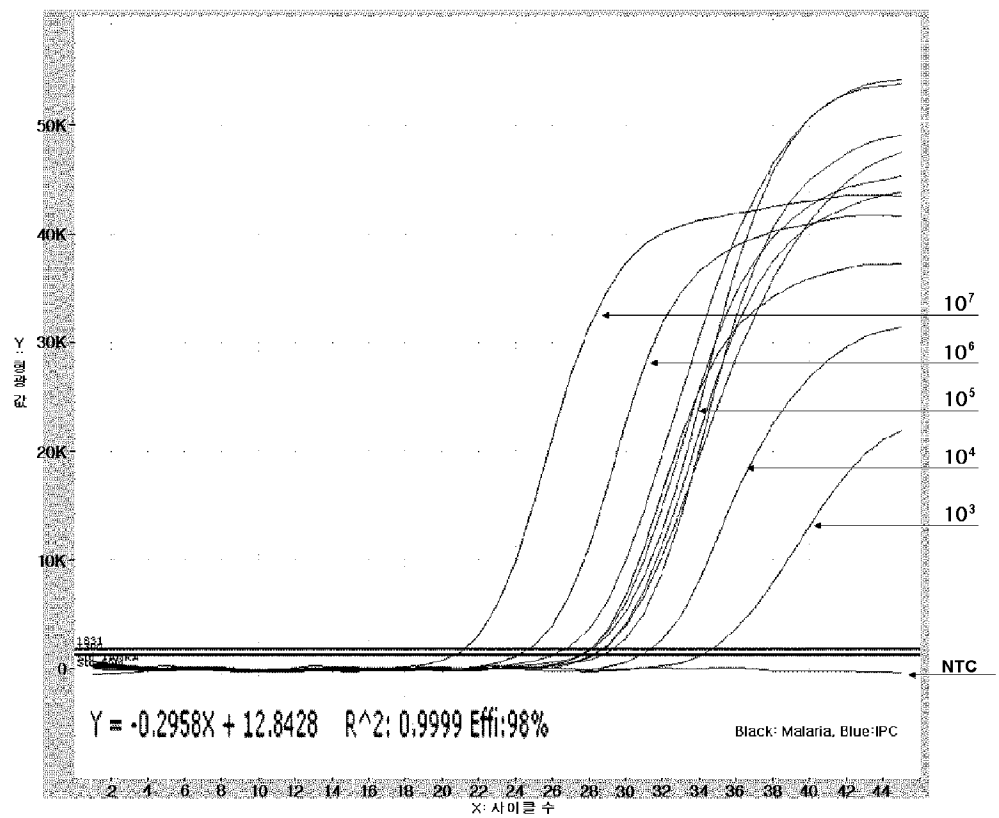
[Fig. 21]



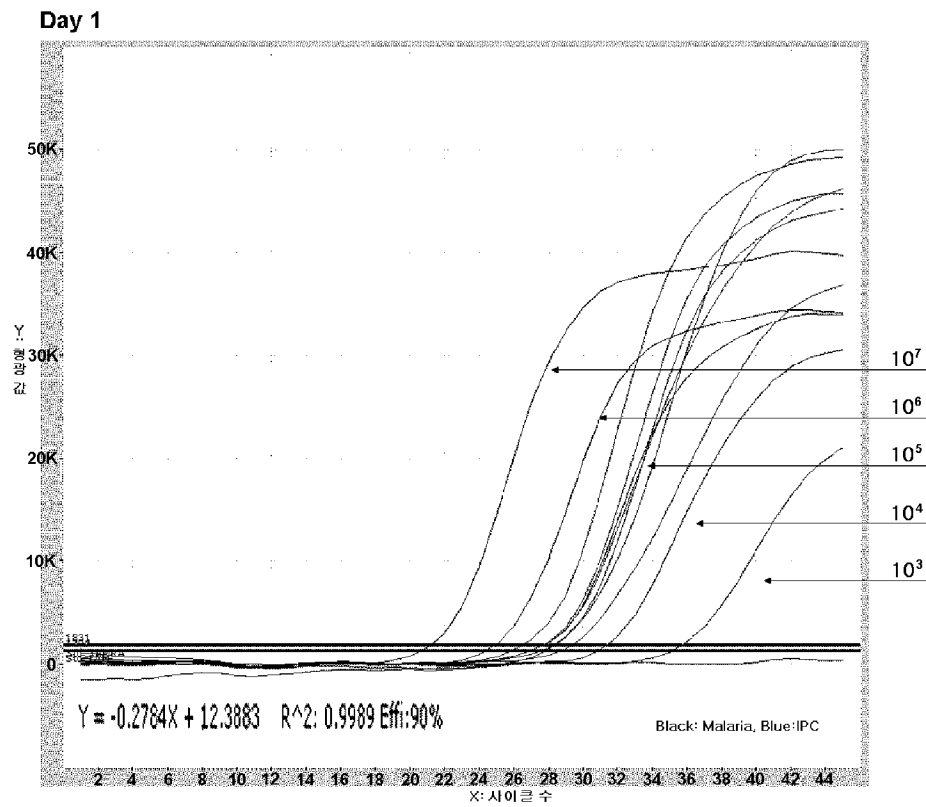
[Fig. 22]



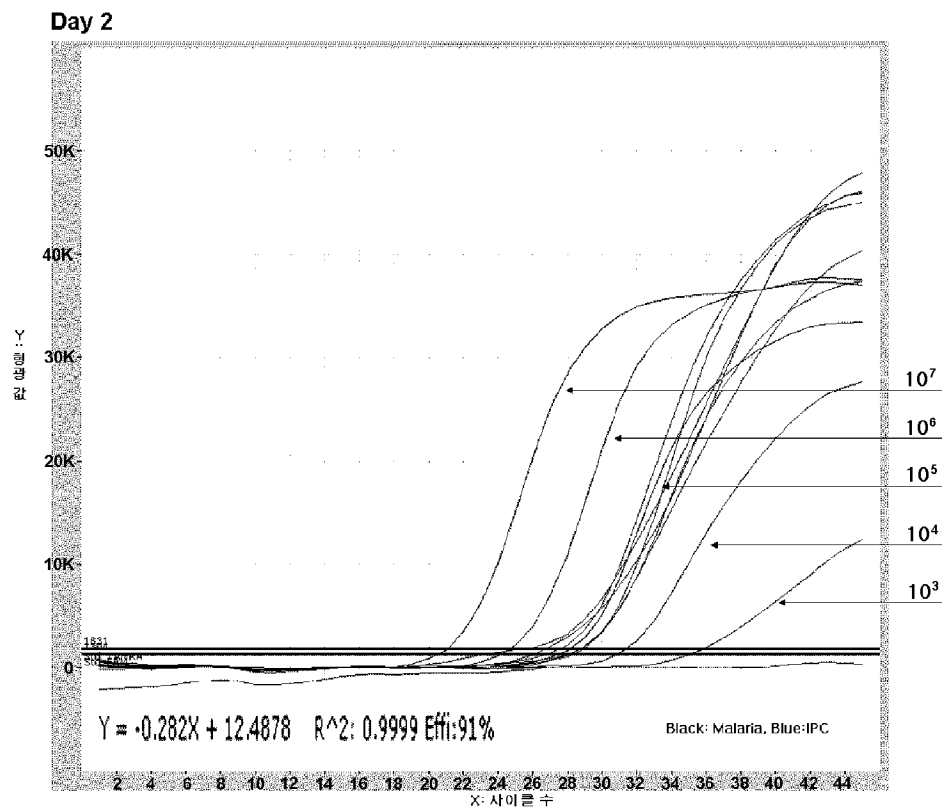
[Fig. 23]



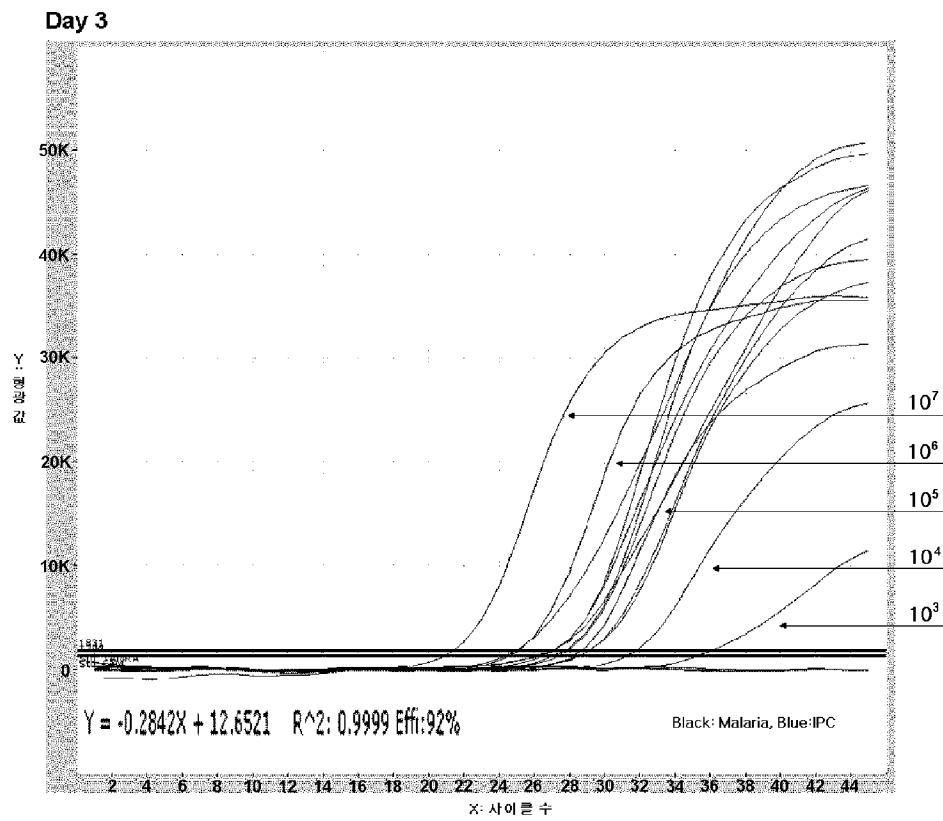
[Fig. 24]



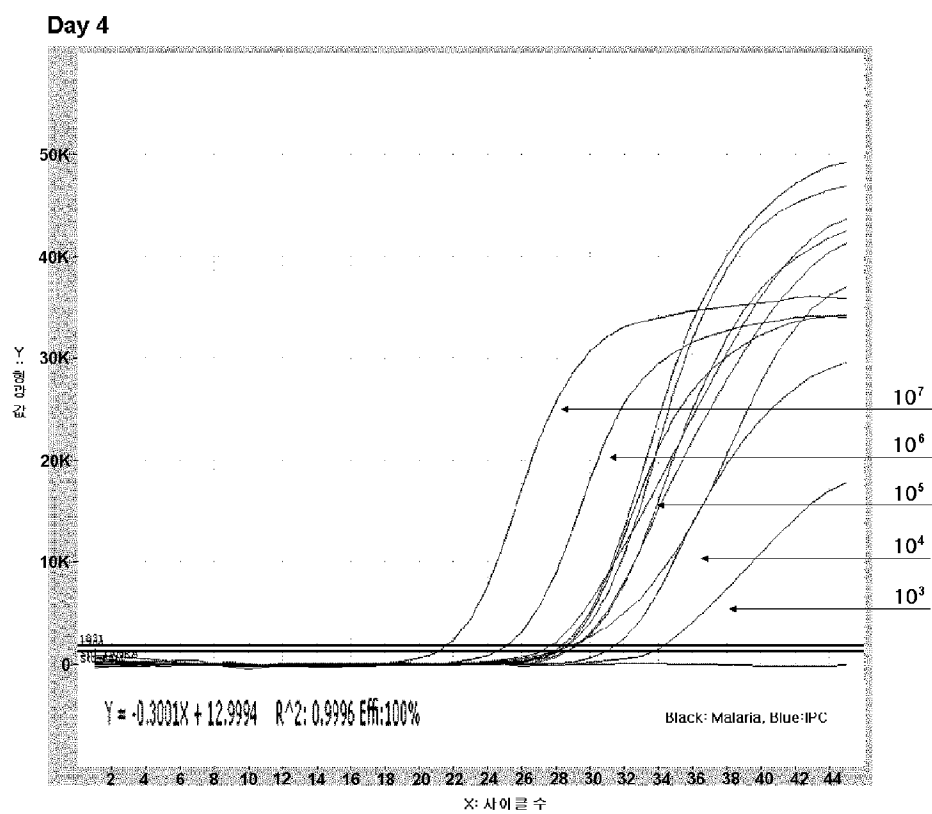
[Fig. 25]



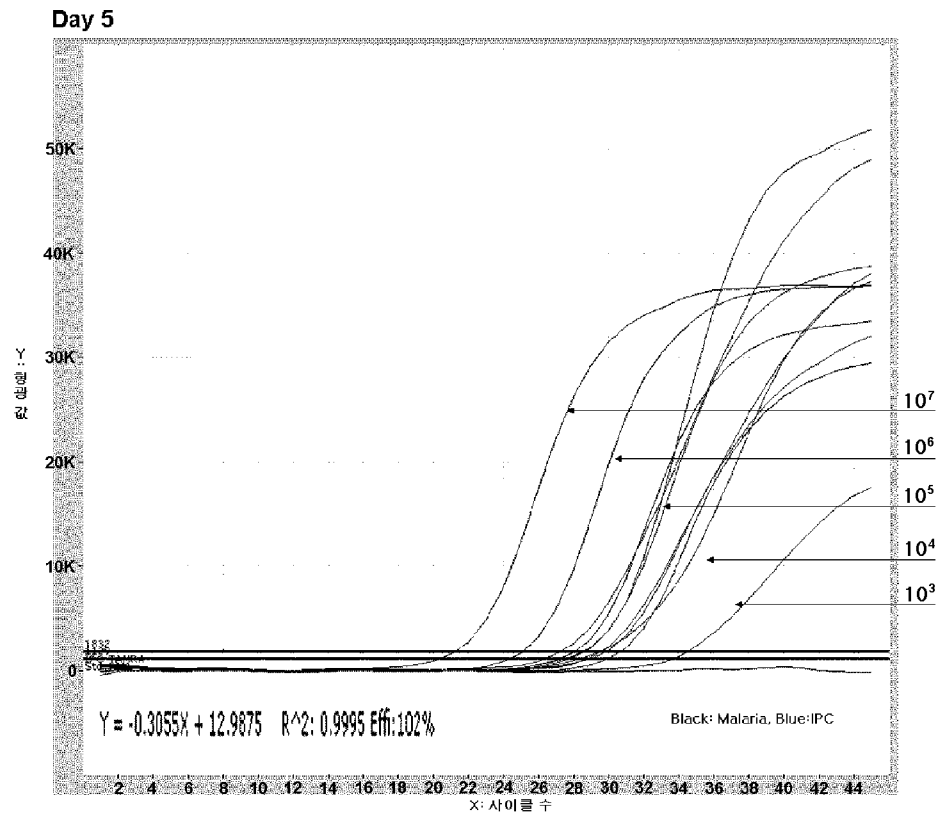
[Fig. 26]



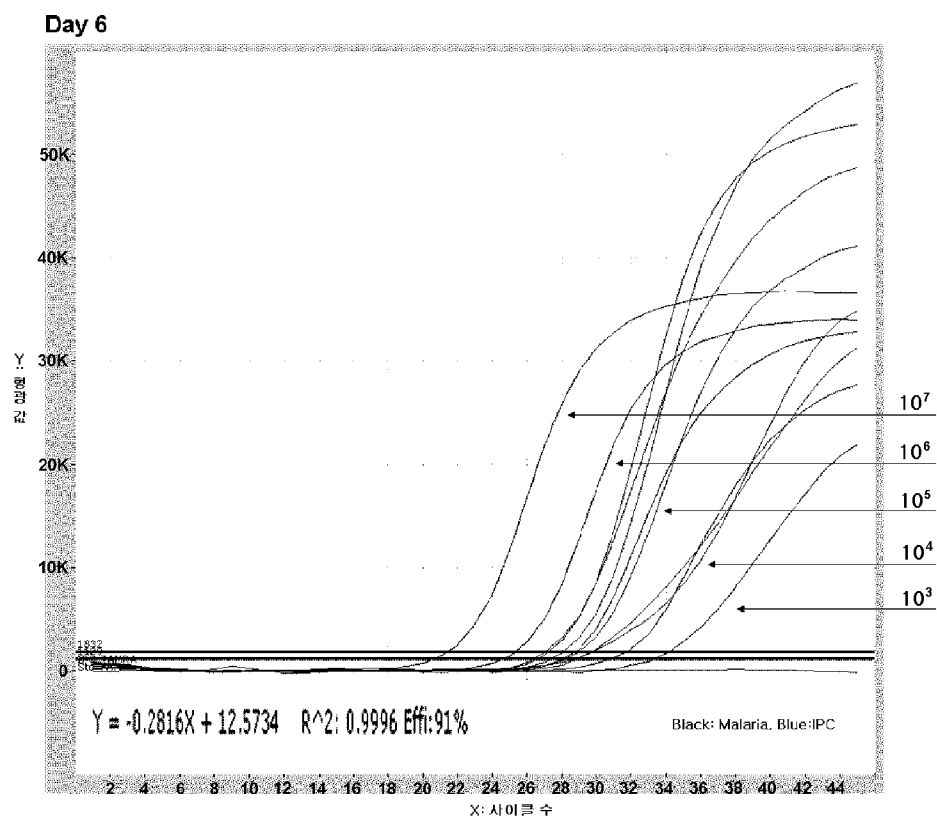
[Fig. 27]



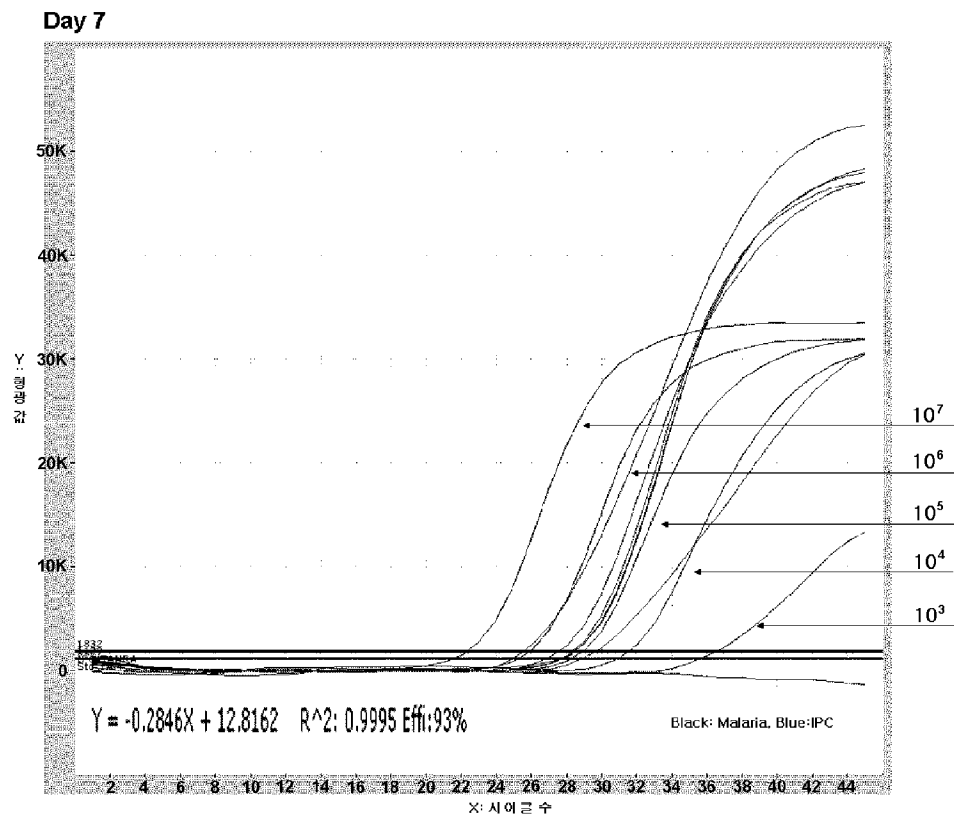
[Fig. 28]



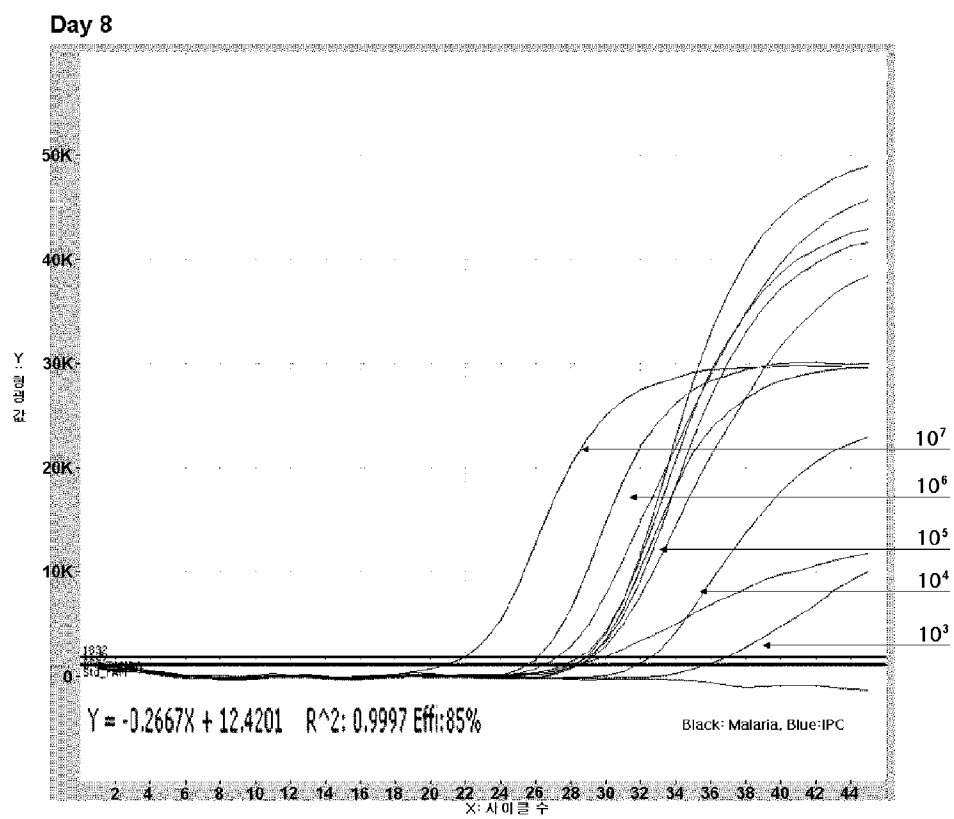
[Fig. 29]



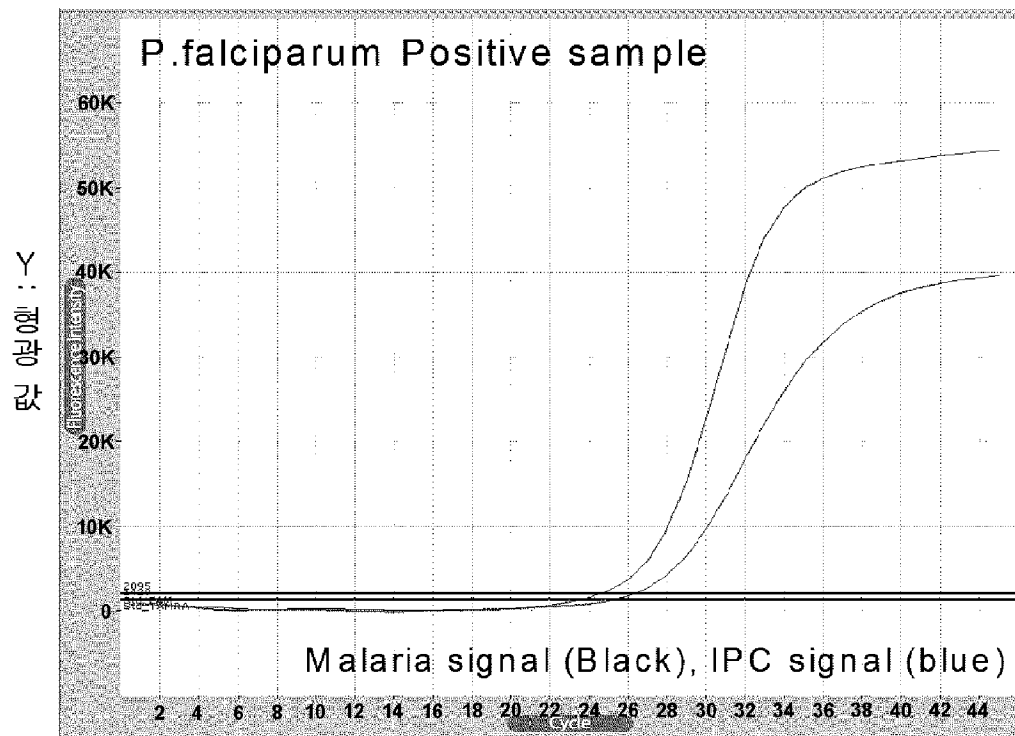
[Fig. 30]



[Fig. 31]

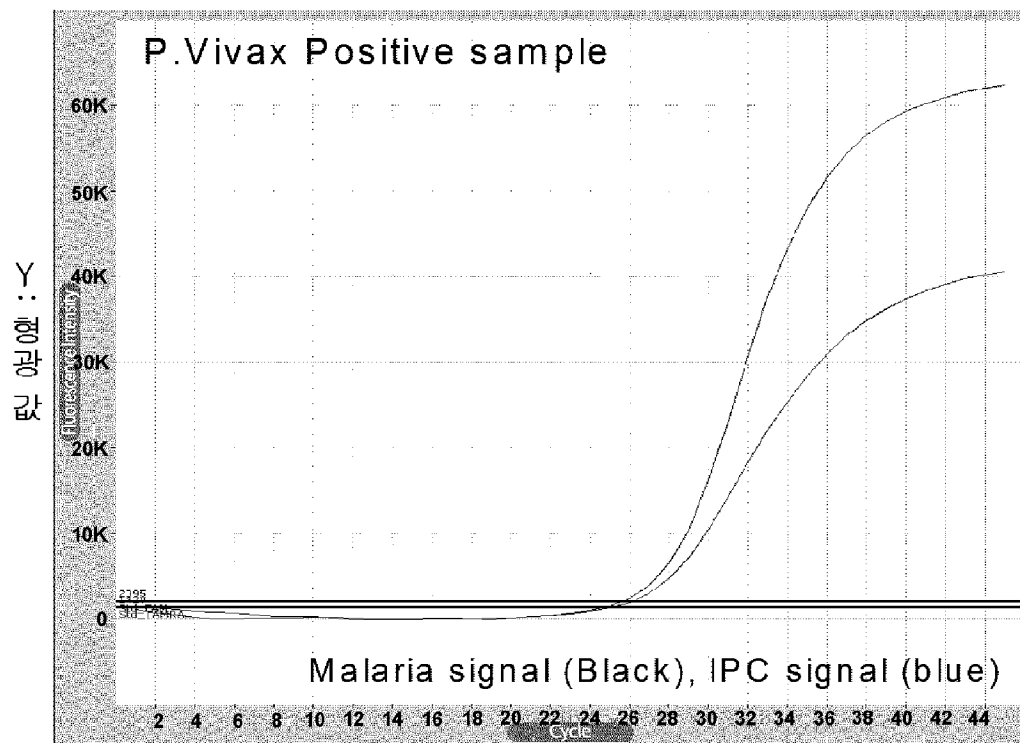


[Fig. 32]



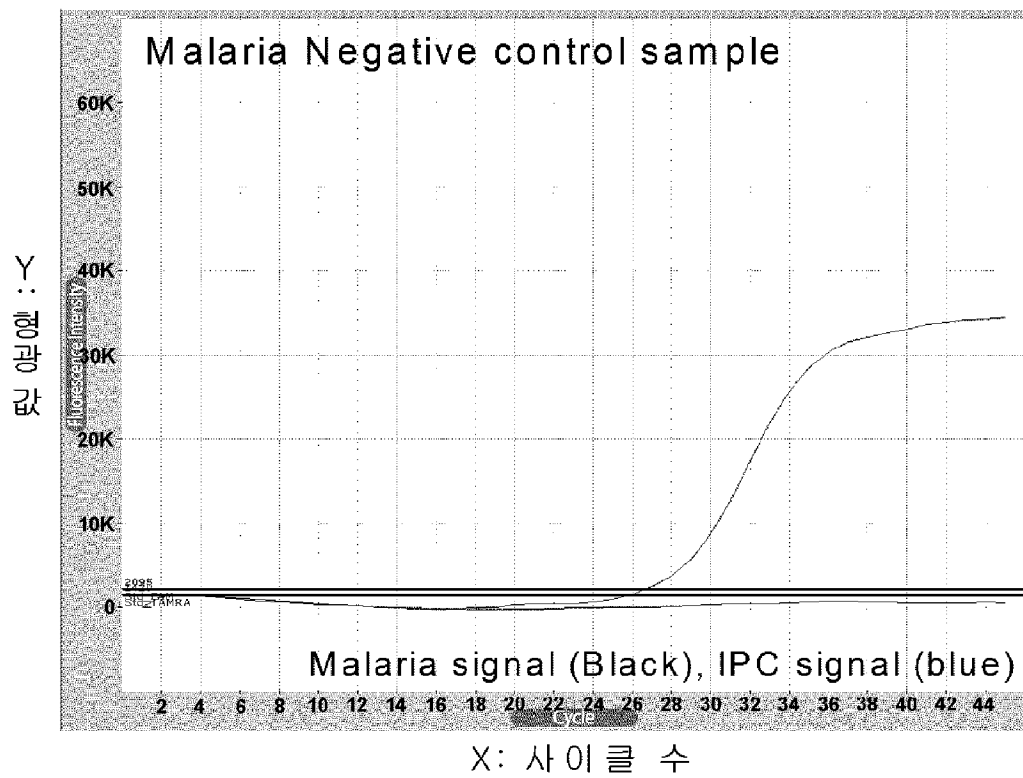
X: 사이클 수

[Fig. 33]

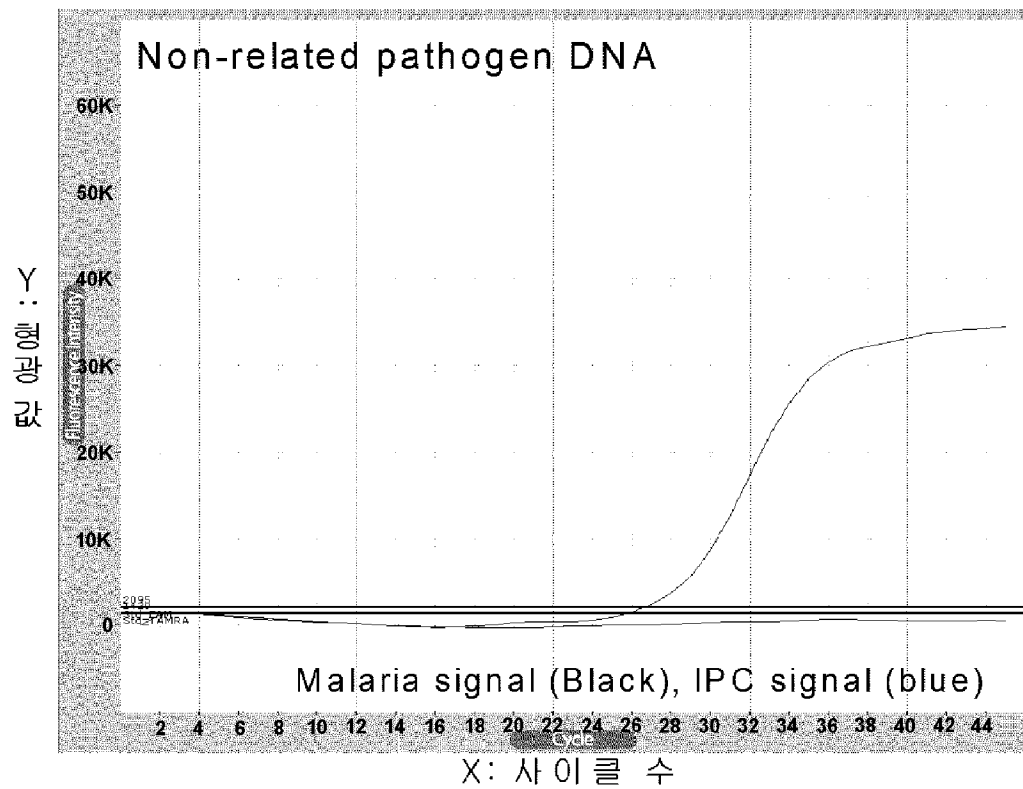


X: 사이클 수

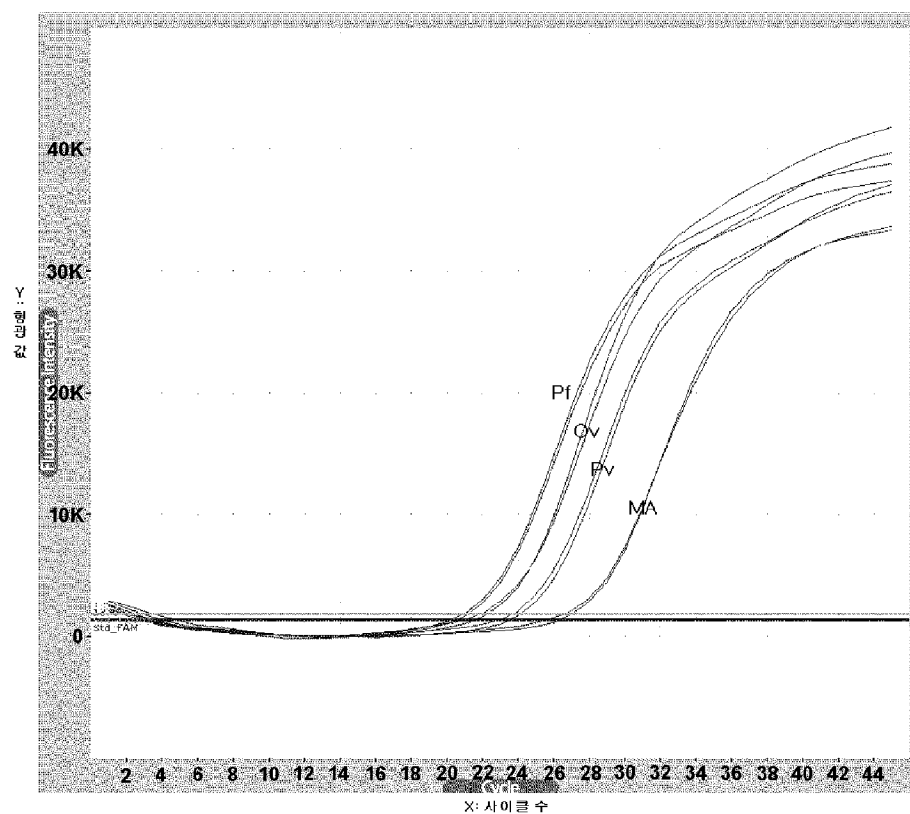
[Fig. 34]



[Fig. 35]



[Fig. 36]



[Fig. 37]

Type	Ct value	Concentration
MA	26.38	19694
	25.76	29349
Pf	20.59	81615.5
	20.25	1010314.8
Ov	21.63	417528.7
	21.00	626723.5
Pv	23.06	166021.3
	23.54	122408.3

[Fig. 38]

