

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0057528
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/6848 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 1/6848 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0137696
(22) 출원일자 2022년10월24일
심사청구일자 2022년10월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임채승
경기도 안양시 동안구 동편로 135, 402동 903호(관양동, 동편마을)
장웅식
서울특별시 동작구 여의대방로 28, 102동 108호(신대방동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

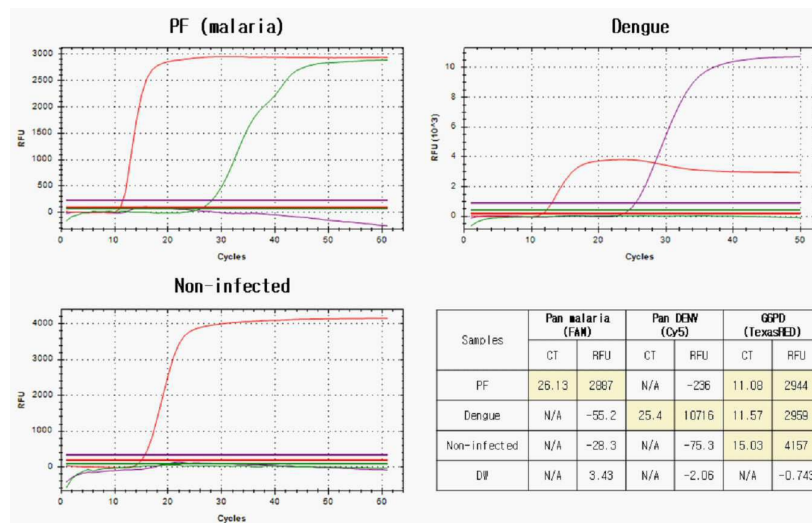
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 말라리아 및 뎡기바이러스 검출용 동시 다중 고리매개 등온증폭 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 말라리아 열원충 및 뎡기바이러스 검출을 위한 다중 등온 증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것으로서, 본 발명에 의하면 고리매개 등온증폭 반응에 의해 PCR기기 없이도 일 회의 검사로 말라리아 및 뎡기열을 빠르고 정확도 높게 검출할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2527/101 (2019.08)
C12Q 2537/143 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036376
과제번호	HR20C0021020022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	신종 감염병 초고속 정밀진단기술 개발 및 사업화
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 구로병원
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345353451
과제번호	2022R1I1A1A01063976
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	현장진단을 위한 호흡기/혈액검체 비원심 핵산추출법 및 다중 루프 매개 증폭
기반 측면 유동 칩 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 6 및 서열번호 8 내지 14의 프라이머를 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브를 추가로 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브는 각각 5' 말단에 서로 다른 형광표지물질을 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 형광표지물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(terramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadycarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 소광자(quencher)를 추가로 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 킨처(Blackberry Quencher), 및 아이오와 블랙(Iowa black)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 16 내지 서열번호 22의 내부대조군 프라이머 세트를 포함하는 것인, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 8

제 1항 내지 제 4항 및 제 7항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 조성물.

청구항 9

제 8항의 조성물을 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 키트.

청구항 10

- (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
- (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 8 내지 14의 프라이머, 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브를 이용하여 LAMP 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,
상기 (2) 단계에서의 상기 등온증폭반응은 서열번호 16 내지 서열번호 22의 프라이머 세트를 더 포함하여 이루어지는 것인, 말라리아 및 뎅기바이러스 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,
상기 (1) 단계의 상기 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 혈액(blood) 및 인두 도말(pharyngeal swab) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 말라리아 및 뎅기바이러스 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 말라리아균 및 뎅기바이러스를 동시에 검출할 수 있는 고리매개 등온증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0003] 2019년까지 국외유입 감염병은 꾸준히 증가되어 왔고(2018년 597명에서 2019년 755명), 국외 유입 감염병중 뎅기열(36%)와 말라리아(10%)는 해외감염병 전체의 거의 절반을 차지한다 (2019년 국외유입 감염병 유입국가 현황. 질병관리본부). 특히, 해외감염병 질환중 모기 매개 감염성 질환이 가장 위험한 것으로 알려져 있다. 말라리아는 열대, 아열대, 및 일부 온대 기후 지역에서 광범위하게 발생하는 원충 질환으로, 매년 약 3-5억의 말라리아 환자가 발생하여 그 중 100만 명 이상이 사망하고 있는 급성 열성 감염증이다(Feng, We et al., Molecular diagnosis of COVID-19: challenges and research needs. Anal. Chem. 2020;92(15):10196-10209. 등). 말라리아는 열룩날개모기속(anopheline)에 속하는 암컷 모기를 매개로 플라스모디움(*Plasmodium*)속 원충이 사람의 혈액 내로 유입되어 적혈구에 기생하여 생기는 열병이다. 약 170종의 플라스모디움이 존재하나 사람을 주 숙주로 하는 말라리아의 병원체는 열대열원충(*P. falciparum*), 삼일열원충(*P. vivax*), 사일열원충(*P. malariae*), 난형열원충(*P. ovale*) 등 4종이다. 말라리아는 열과 독감과 같은 증상을 특징으로, 발열, 오한, 두통, 몸살, 전신통증 등이 간격을 두고 나타난다.

[0004] 뎅기열도 모기에 의해 전파되는 급성 열성 질환으로, 열대 지방, 아열대 지방인 아시아, 남태평양 지역, 아프리카, 아메리카 대륙에서 주로 발생하는 질병이다. 뎅기바이러스는 DEN-1, DEN-2, DEN-3 및 DEN-4형 네 개의 혈청형이 존재하는 것으로 알려져있으며, 뎅기열의 잠복기는 보통 4-7일 정도이고, 증상으로는 발열, 두통, 안와주위 통증, 근육통, 관절통, 발적, 출혈 소견 또는 백혈구감소증 등의 증상이 나타난다(Wiwanitkit V. Dengue fever: diagnosis and treatment. Expert review of anti-infective therapy. 2010;8(7):841-845.). 현재, 말라리아 진단을 위해 현재 사용 가능한 진단 방법에는 혈액 도말, 신속 진단 키트(RDT) 적용 및 분자 진단이 있고, 뎅기바이러스 진단에는 RDT 키트와 PCR법이 보편적으로 사용되고 있다. 말라리아의 대표적인 진단시료인 혈액 도말은 두꺼운 도말과 얇은 도말과 동시에 시행한 후 김자 염색을 통해 현미경으로 플라스모디움의 존재를 확인하지만 염색 과정에서 현미경 검사까지 시간이 많이 소요되고 숙련된 전문가가 필요하다(Murray CK et al., Update on rapid diagnostic testing for malaria. Clinical microbiology reviews. 2008;21(1):97-110.). 뎅기 RDT 키트나 말라리아 RDT 키트의 경우는 20분 이내에 확인할 수 있으나 민감도가 낮다는 단점이 있다(Lim JK et al., A systematic review of the economic impact of rapid diagnostic tests for dengue. BMC health services research. 2017;17(1):1-9. 등). 분자진단법인 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 뎅기바이러스나 말라리아 진단법 중 가장 높은 민감도와 특이도를 가지고 있으나, PCR은 약 2-3시간이 소요되며 열 순환 기능을 갖춘 고가의 장비와 숙련된 전문가가 필요하다(Cook J. et al., Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malaria journal. 2015;14(1):1-6.).

[0005] 최근, 온도 변화 없이 일정한 온도에서 유전자를 증폭하는 등온 증폭 반응법(LAMP)이 개발되었다(Notomi T. et al., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids research. 2000;28(12):e63.). LAMP법은 주형에 상보적인 프라이머 6개를 사용하여 각기 다른 8개의 부위를 인식하여 유전자 증폭을 진행한다. 기존의 PCR법과 비교하였을 때, 온도의 변화가 없이 증폭할 수 있다는 점에서 검사의 소모시간을 단축할 수 있고, 온도 변화를 위한 값비싼 장비 없이 검사를 진행할 수 있다(Sirichaisinthop J. et al., Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2011;85(4):594.). LAMP는 이와 같은 장점으로 감염질환에 적용된 바 있으나, 뎅기바이러스와 말라리아를 멀티플렉스 LAMP로 한 번에 동시에 진단하는 검사법에 대해서는 개발된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2226356 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 뎅기바이러스 및 말라리아 감염을 빠른 시간 안에 동시에 진단할 수 있는 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 8 내지 14의 프라이머를 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브를 추가로 포함할 수 있다.
- [0012] 일 측에 따르면, 상기 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브는 각각 5' 말단에 서로 다른 형광표지물질을 포함할 수 있다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 형광표지물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디 카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어진 소광자(quencher)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), 및 아이오와 블랙(Iowa black)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 프라이머 세트는 서열번호 16 내지 서열번호 22의 내부대조군 프라이머 세트를 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상술한 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트를 포함하는, 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 조성물이 제공된다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면 상술한 조성물을 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 키트가 제공된다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면,
- [0020] (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
- [0021] (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 6 및 서열번호 8 내지 14의 프라이머, 서열번호 7 및 서열번호 15의 염기서열로 이루어진 프로브를 이용하여 LAMP 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0022] (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 진단을 위한 정보제공방법이 제공된다.
- [0023] 일 측에 따르면, 상기 (2) 단계에서의 상기 등온증폭반응은 서열번호 16 내지 서열번호 22의 프라이머 세트를 더 포함하여 이루어지는 것일 수 있다.
- [0024] 일 측에 따르면, 상기 (1) 단계의 상기 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 혈액(blood) 및 인두 도말(pharyngeal swab) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르면, 고가의 PCR장비나 숙련된 인력 없이도 현장에서 빠르게 말라리아 및 뎅기바이러스의 동시검출이 가능하다. 본 발명의 프라이머 세트는 말라리아 열원충 및 뎅기바이러스 4개혈청형에 대하여 높은 민감도와 정확도를 나타내며, 검체의 말라리아 및 뎅기바이러스 감염여부를 빠른 시간 내에 진단할 수 있다. 또한, 내부 대조균을 포함하여 위음성배제가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 범 말라리아 프라이머 세트의 타겟 서열 부위이다.
 도 2는 본 발명의 범 뎅기바이러스 프라이머 세트의 타겟 서열 부위이다.
 도 3은 본 발명의 프라이머 세트를 임상검체에 적용한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명자들은 현장에서 고가의 장비나 숙련된 인력 없이도 말라리아 및 뎅기바이러스의 감염을 빠르고 신속하며, 동시에 진단하기 위한 LAMP 프라이머에 관해 본 발명을 완성하였다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어 “말라리아”는 열원충(플라스모디움, *Plasmodium*) 속에 속하는 원충에 감염되어 발생하는 급성 열성질환을 의미하며, 말라리아, 말라리아 감염증 등과 동일한 의미로 교환적으로 사용된다. 본 명세서에서 사용된 용어 “pv, pf, pm 및 po”는 각각 *Plasmodium vivax* (삼일열원충), *Plasmodium falciparum* (열대열원충), *Plasmodium malariae* (사일열원충), *Plasmodium ovale* (난형열원충)의 약자이며, 이들 열원충이 일으키는 상술한 말라리아 감염증을 각각 지칭하는 의미로 사용될 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어 “뎅기열” 또는 “뎅기”는 뎅기바이러스에 의해 발생하는 전염성 열성질환을 의미한다. 상기 뎅기바이러스는 *Flavivirus* 속 *dengue virus* 종의 바이러스를 의미하며, 알려진 1 내지 4의 혈청형(serotype)을 갖는 것일 수 있다.

[0031] 구체적으로, 본 발명자들은 플라스모디움 속 열원충의 18s rRNA 공통부위에 특이적인 프라이머와 프로브로 구성되는 프라이머 세트를 LAMP 기반으로 제작하였으며, 뎅기바이러스의 4개 혈청형의 poly 유전자 공통부위에 특이적인 프라이머와 프로브로 구성되는 프라이머 세트를 LAMP 기반으로 제작하였다. 또한, 상기 말라리아 검출용 프라이머 세트와 뎅기바이러스 검출용 프라이머 세트가 서로 반응하지 않고, 동시에 LAMP 반응을 수행하는 멀티플렉스 LAMP PCR을 수행하여도 상호간 결합하거나 반응성에 영향을 주지 않음을 확인하여, 이들 프라이머 세트를 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 멀티플렉스 LAMP용 프라이머 세트를 완성하게 되었다. 본 발명의 LAMP 기반의 프라이머 세트는 전통적인 PCR과 달리 온도변화를 요구하지 아니하여 단순하고 가벼운 증폭기기를 이용할 수 있고 분석에 소요되는 시간을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

[0032] 구체적으로 본 발명은, 서열번호 1 내지 6으로 이루어지는 플라스모디움 속의 18s rRNA 공통부위에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트와 서열번호 7로 이루어지는 프로브를 제공한다. 또한 본 발명은 서열번호 8 내지 14로 이루어지는 뎅기바이러스의 poly 유전자 공통부위에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트와 서열번호 15로 이루어지는 프로브를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출용 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명의 말라리아 및 뎅기바이러스 동시검출을 위한 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트의 구성은 하기 표 1 내지 표 4와 같으며, 반응 시간 및 온도는 하기 표 6과 같다. 상술한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 조성물의 조성 및 반응 조건은 최적의 실시예를 도출하기 위한 일 예시일 뿐이며, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 한편, 본 발명의 프로브는 5' 말단이 형광표지물질로 표지된 것일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 7의 프로브, 서열번호 15의 프로브 및 서열번호 22의 프로브가 서로 발하는 파장범위가 상이한 형광물질로 표지될 수 있다.

[0036] 상기 각 프로브에 부착되는 형광물질은 형광을 발하는 것이라면 제한되지 아니하나, 그 비제한적인 예로서 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-

tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadycarbocyanine) 등이 있다.

- [0037] 본 발명의 내부대조군(internal control)로 사용된 G6PD 유전자를 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 세트는 서열번호 16 내지 서열번호 21의 프라이머를 포함하며, 서열번호 22의 프로브를 더 포함할 수 있다. 상기 내부 대조군의 존재로 인해 시료가 전혀 검출되지 않아 발생할 수 있는 위음성을 배제할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 말라리아 또는 뎅기열의 진단이 필요한 개체의 생물학적 시료에서 게놈 DNA 및 또는 RNA를 분리하고, 상기 DNA 및 또는 RNA를 주형으로 하여 상기 프라이머 세트, 조성물 및 키트 중 어느 하나를 이용하여 LAMP를 수행함으로써 표적 서열을 증폭하고, 그 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 및 뎅기바이러스 동시진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 “개체”는 말라리아 또는 뎅기바이러스의 진단이 필요한 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있다. 또한, 본 발명에서 “생물학적 시료”는 체내에서 말라리아 또는 뎅기바이러스가 검출될 수 있는 부위의 도말시료, 세척시료 등이라면 제한되지 아니하나 바람직하게는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 혈액(blood) 및 인두 도말(pharyngeal swab) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, “등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)”은 기존 PCR법과 달리 PCR 사이클이 필요 없는 Bst, Gsp 등의 중합효소를 이용하여 등온의 조건에서 반응을 수행하는 방법으로, 기본적으로 4개의 프라이머를 이용하여, 양끝을 고리(loop) 구조로 합성하여 유전자의 특정 부위를 무한대로 증폭하고, 증폭된 DNA 산물을 형광 검출용 시약을 이용하거나 침전 반응시켜 증폭 유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 상기 프라이머 세트를 포함하는 키트는 말라리아 및 뎅기바이러스의 진단을 위한 등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)에 사용되는 것이 바람직하며, 등온증폭반응은 표적 DNA를 LAMP에 의하여 증폭하는 단일-단계(one-step) LAMP일 수 있고, 실시간 LAMP (real-time LAMP)일 수 있으며, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, “프라이머 (primer)”란 적절한 완충용액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0043] 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ^{32}P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, “내부 프라이머(inner primer)”는 주형 DNA에 결합하여 새로운 DNA 사슬 합성의 시작점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “외부 프라이머(outer primer)”는 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합한 위치보다 더 바깥쪽에서 주형 DNA에 결합하는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 DNA 사슬이 신장된 이후, 외부 프라이머와 주형 DNA의 결합으로 사슬 변위(strand displacement)가 발생하여 먼저 형성된 사슬이 떨어져 나오게 된다.
- [0046] 본 발명에 있어서, “고리 프라이머(loop primer)”는 상기 내부 프라이머 및 외부 프라이머가 주형 DNA에 결합

하여 형성된 초기 줄기 고리(stem loop) 구조 사슬이 고리(loop) 구조 생성 횟수를 증가시켜 결과적으로 전체 반응을 가속화시킬 수 있도록 하는, 뉴클레오타이드 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.

[0047] 본 발명에 있어서, “소광자(quencher)”는 프로브의 형광표지물질의 형광을 평시에 흡수하다가 프로브가 분해되는 경우 형광표지물질과 소광자가 서로 분리되어 형광표지물질에서 형광을 발할 수 있게 하는 물질을 의미하며, 바람직한 예로는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 및 아이오와 블랙(Iowa black) 으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.

[0048] 본 발명에 있어서, 선택적으로 내부대조군이 이용될 수 있다. 바람직하게는 인간 G6PD 유전자를 타겟팅하는 프라이머 세트가 PCR 과정에서 추가적으로 도입될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 프라이머 세트의 프로브는 말라리아 및 뎅기바이러스를 타겟팅하는 프로브와 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있어, 3 이상의 형광을 동시에 검출할 수 있다.

[0050] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0052] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0054] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0056] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0057] 실시예 1. LAMP 프라이머 세트 설계

[0058] 말라리아 4종(pf, pv, pm 및 po)의 18s 유전자 공통부위 서열을 바탕으로 범 말라리아(Pan malaria) 검출용 프라이머/프로브 세트를 디자인하여 하기 표 1에 나타내었다. 타겟 서열 부위는 도 1에 나타내었다.

표 1

서열 번호	타겟 부위	이름	서열(5'-3')	길이(bp)
----------	-------	----	-----------	--------

1	18s rRNA(말라리아 pf, pv, pm 및 po)	Pan malaria F3	TCC ATT AAT CAA GAA CGA AAG T	22
2		Pan malaria B3	ACT CTT GTC TTA AAC TAG TGA GT	23
3		Pan malaria FIP	TCC AAM RCC TAG TYG GYA TAG TTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC A	43
4		Pan malaria BIP	GAG TAT TCG CGC AAG CGA GAC CCG TGT TGA GTC AAA TTA A	40
5		Pan malaria LF	TGG TTA AGA TTA CGA CGG TAT C	22
6		Pan malaria LB	GTT AAA AGA ATT GAC GGA AGG GC	23
7		Pan malaria LB FAM	FAM - CGG GCC CGT ACA AAG GGA ACA CCC ACA CTC CGG TTA AAA GAA TTG ACG GAA GGG C	55

Dengue 바이러스 4개 혈청형(1-4)의 poly 유전자 공통부위 서열을 바탕으로 범 Dengue 바이러스(Pan DENV) 검출용 프라이머/프로브 세트를 디자인하여 하기 표 2에 나타내었다. 타겟서열부위는 도 2에 나타내었다.

표 2

서열 번호	타겟 부위	이름	서열(5'-3')	길이(bp)
8	Poly 유전자(DENV 1-4)	Pan DENV F3	GTG GAC CGA CAA RRA CAG	18
9		Pan DENV B3-1	ART TTY AWK GGT CCY YCK CC	20
10		Pan DENV B3-2	ATC CGT AAG GGT CCT TTC CC	20
11		Pan DENV FIP	YCR YCT TYT TYC GTT GGT TGC TYA ACR YAG TKC TAA CAG TTT	42
12		Pan DENV BIP	CTW TCA ATA TGC TGA AAC GCG TCC DDK TGA GAA TCT CTT YRY CA	44
13		Pan DENV LF	TTK WYC AGA GAT CTG CTC TCT A	22
14		Pan DENV LB	GAG AAA CCG YGT RTC RAC	18
15		Pan DENV LF Cy5	Cy5 - GTC AGT GCA GGC TCC CGT GTT AGG ACG AGG GTA GGT TKW YCA GAG ATC TGC TCT CTA	57

내부대조군을 위해 G6PD를 타겟하는 프라이머/프로브 세트를 디자인하였고, 소광자와 함께 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

서열 번호	타겟 부위	이름	서열(5'-3')	길이(bp)
16	G6PD	IC G6PD F3	TGT CAC CAG CAA CAT CTC GA	20
17		IC G6PD B3	TCC TCA GGG AAG CAA ATG AC	20
18		IC G6PD FIP	ATA GCA GAG AGG CTG CCT ACG GTT TTG ATG TCC CCT GTC CCA CCA	45
19		IC G6PD BIP	AAG AAA AGC AGA CGC AGC AGC TTT TTG GGG CTG TTT GCG GAT T	43
20		IC G6PD LF	GGG GTG GCC ATG GAG TGC	18
21		IC G6PD LB	TCC CAA CCT CAA TGC CCT GC	20
22		IC G6PD LB TexasRED	TexasRED - CGG GCC CGT ACA AAG GGA ACA CCC ACA CTC CGT CCC AAC CTC AAT GCC CTG C	52
23		lamp_PROBE2_QUANCHER	CCT ACC CTC GTC CTA ACA CGG GAG CCT GCA CTG AC-BHQ2	35
24		lamp_PROBE4_QUANCHER	GAG TGT GGG TGT TCC CTT TGT ACG GGC CCG-BHQ1	30

RT-LAMP 프라이머믹스 조성은 표 4에 표시하였고, LAMP 반응용 조성물은 표 5에, LAMP반응조건은 표 6에 나타내었다.

표 4

범 말라리아 LAMP 프라이머	μL	범 땡기바이러스 LAMP 프라이머	μL	내부대조군 LAMP 프라이머	μL
Pan malaria F3	4	Pan DENV F3	4	IC G6PD F3	4
Pan malaria B3	4	Pan DENV B3-1	4	IC G6PD B3	4
Pan malaria FIP	32	Pan DENV B3-2	4	IC G6PD FIP	32
Pan malaria BIP	32	Pan DENV FIP	32	IC G6PD BIP	32
Pan malaria LF	10	Pan DENV BIP	32	IC G6PD LF	10
Pan malaria LB	4	Pan DENV LF	8	IC G6PD LB	4
Pan malaria LB FAM	6	Pan DENV LB	10	IC G6PD LB TexasRED	6
		Pan DENV LF Cy5	6		
DW	8	DW	2	DW	8
Final Vol	100	Final Vol	100	Final Vol	100

표 5

구분	부피(μL)
RM	12.5
증류수	1.6
프라이머믹스	0.6 (범 말라리아 프라이머)
	1.5 (범 땡기바이러스 프라이머)
	0.3 (G6PD 내부대조군 프라이머)
소광자 P4	1.5
소광자 P2	2
템플릿	5
합계	25

표 6

원스텝 RT-LAMP 검출 실험		
온도	반응시간	
59 °C	1분	60 Cycle
전체반응시간	60분	

실시예 2. 임상검체 대상 검출실험

임상검체를 대상으로 상기 실시예 1에 기재된 조성을 갖는 프라이머 조성물을 이용해 실시예 1에 기재된 방법으로 멀티플렉스 LAMP 실험을 수행하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 적색 선은 내부대조군의 텍사스 레드, 녹색 선은 범 말라리아 프라이머 조성물의 FAM, 보라색 선은 범 땡기바이러스 프라이머 조성물의 Cy5 형광을 나타낸다. 도 3에서 나타나는 바와 같이 말라리아 감염 개체에서는 내부대조군 및 범 말라리아 프라이머의 형광이 검출되며, 땡기바이러스 감염 개체에서는 내부대조군 및 범 땡기바이러스 프라이머의 형광이 검출되고, 음성검체에서는 내부대조군의 형광만이 검출되어 본 발명의 프라이머 세트가 말라리아 감염군 및 땡기바이러스 감염군을 동시에 검출하고 이를 음성과 구별할 수 있음을 확인하였다.

실시예 3. 민감도 테스트

말라리아 4종(pf, pv, pm 및 po)에 대하여 플라스미드 DNA를 이용해 제작된 양성 대조군(positive control)을 1×10^7 의 농도부터 1×10^1 까지 희석하여 말라리아 모노플렉스와 멀티플렉스 프라이머세트의 민감도를 확인하여 하기 표 7 내지 10에 나타내었다. pf, pv, pm 및 po의 모노플렉스 LAMP 실험에서는 각각 10^4 copy, 10^5 copy, 10^4 copy, 10^4 copy에서 증폭이 확인되었고 멀티플렉스 LAMP 실험에서는 각각 10^3 copy, 10^4 copy, 10^4 copy, 10^3 copy에서 증폭이 확인되었다. 종합적으로 멀티플렉스 LAMP 프라이머세트는 각각의 말라리아 4종 plasmid DNA 중

pm을 제외하고 말라리아 모노플렉스 LAMP 프라이머세트보다 평균적으로 10배가량 높은 민감도를 나타냈다.

표 7

<i>pf plasmid DNA</i>	Pan malaria LAMP (Monoplex)		Pan malaria LAMP (Multiplex)	
<i>Copies/μl</i>	CT	RFU	CT	RFU
10 ⁷	15.27	3233	18.48	1508
10 ⁶	18.19	3582	21	1479
10 ⁵	20.25	3563	24.08	1464
10 ⁴	23.26	3660	26.66	1394
10 ³	N/A	-3.28	34.52	1363
10 ²	N/A	-1.5	N/A	-11.4
10 ¹	N/A	0.507	N/A	-19.8
DW	N/A	-15.3	N/A	-15.3

표 8

<i>pv plasmid DNA</i>	Pan malaria LAMP (Monoplex)		Pan malaria LAMP (Multiplex)	
<i>Copies/μl</i>	CT	RFU	CT	RFU
10 ⁷	18.87	3556	22.8	1184
10 ⁶	21.58	3888	25.5	1345
10 ⁵	27.94	3562	27.15	1454
10 ⁴	N/A	-1.53	37.59	1431
10 ³	N/A	-2.77	N/A	-25.7
10 ²	N/A	-1.84	N/A	-7.41
10 ¹	N/A	-2.59	N/A	-12.1
DW	N/A	-0.495	N/A	2.29

표 9

<i>pm plasmid DNA</i>	Pan malaria LAMP (Monoplex)		Pan malaria LAMP (Multiplex)	
<i>Copies/μl</i>	CT	RFU	CT	RFU
10 ⁷	19.55	3879	24.07	1308
10 ⁶	21.61	4143	27.37	1431
10 ⁵	22.5	3961	30.43	1311
10 ⁴	45.91	3854	32.27	1385
10 ³	N/A	-2.63	N/A	-8.55
10 ²	N/A	-2.96	N/A	-11.2
10 ¹	N/A	-1.47	N/A	-1.47
DW	N/A	2.29	N/A	2.29

표 10

[0076]

<i>po plasmid DNA</i>	Pan malaria LAMP (Monoplex)		Pan malaria LAMP (Multiplex)	
<i>Copies/μl</i>	CT	RFU	CT	RFU
10^7	15.93	3833	20.24	2058
10^6	18.93	3889	24.23	1420
10^5	21.13	4083	26.15	1409
10^4	21.3	3794	30.2	1375
10^3	N/A	-5.18	32.7	1303
10^2	N/A	-3.81	N/A	-15.4
10^1	N/A	-5.65	N/A	-33.7
DW	N/A	-5.29	N/A	-26.6

[0078]

뎡기바이러스 4종(1-4)의 경우, 뎡기바이러스 혈청형 4종(1-4)의 배양액 DNA 샘플을 10분의 1희석배수를 이용하여 10^1 dilution에서부터 10^7 dilution까지 희석하여 뎡기바이러스 모노플렉스 및 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트의 민감도를 확인하여 표 11 내지 14에 나타내었다. 뎡기바이러스 혈청형 1 및 뎡기바이러스 혈청형 2의 경우 뎡기바이러스 모노플렉스 LAMP 프라이머 세트에서는 각각 10^4 dilution, 10^3 dilution에서 증폭이 확인되었고 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트는 10^3 dilution, 10^2 dilution에서 증폭이 확인되어 10배 높은 민감도를 나타냈다. 뎡기바이러스 혈청형 3 및 뎡기바이러스 혈청형 4에 대해서는 뎡기바이러스 모노플렉스 LAMP 프라이머 세트와 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트에서 모두 10^3 dilution 에서 증폭이 확인되어 뎡기바이러스 모노플렉스 LAMP 프라이머 세트와 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트가 유사한 민감도를 나타냈다.

표 11

[0079]

뎡기바이러스1 plasmid DNA	Pan DENV LAMP (Monoplex)		Pan DENV LAMP (Multiplex)	
<i>dilution</i>	CT	RFU	CT	RFU
10^1 dilution	16.26	7037	26.39	6280
10^2 dilution	17.42	7024	27.2	6024
10^3 dilution	25.38	7381	35.95	8305
10^4 dilution	53.64	2729	N/A	244
10^5 dilution	N/A	-3.79	N/A	79
10^6 dilution	N/A	0.539	N/A	337
10^7 dilution	N/A	-122	N/A	0.498
DW	N/A	-12.6	N/A	87

표 12

[0080]

뎡기바이러스2 plasmid DNA	Pan DENV LAMP (Monoplex)		Pan DENV LAMP (Multiplex)	
<i>dilution</i>	CT	RFU	CT	RFU
10^1 dilution	16.3	6285	29.61	7819

10 ² dilution	24.37	7006	33.31	8470
10 ³ dilution	44.11	5598	N/A	102
10 ⁴ dilution	N/A	-7.78	N/A	-1.76
10 ⁵ dilution	N/A	-11.7	N/A	0.827
10 ⁶ dilution	N/A	-28.8	N/A	0.948
10 ⁷ dilution	N/A	676	N/A	-0.727
DW	N/A	45.6	N/A	-2.87

표 13

덴기바이러스2 plasmid DNA	Pan DENV LAMP (Monoplex)		Pan DENV LAMP (Multiplex)	
dilution	CT	RFU	CT	RFU
10 ¹ dilution	30.64	4200	18.94	7151
10 ² dilution	32.22	4473	26.88	7006
10 ³ dilution	41.83	3983	38.78	7051
10 ⁴ dilution	N/A	358	N/A	7.9
10 ⁵ dilution	N/A	451	N/A	55.4
10 ⁶ dilution	N/A	520	N/A	-0.007
10 ⁷ dilution	N/A	626	N/A	411
DW	N/A	560	N/A	244

표 14

덴기바이러스4 plasmid DNA	Pan DENV LAMP (Monoplex)		Pan DENV LAMP (Multiplex)	
dilution	CT	RFU	CT	RFU
10 ¹ dilution	17.27	6869	24.58	7313
10 ² dilution	20.22	7875	28.5	7327
10 ³ dilution	27.55	7444	36.52	8126
10 ⁴ dilution	N/A	-1.91	N/A	9.69
10 ⁵ dilution	N/A	-2.36	N/A	1.67
10 ⁶ dilution	N/A	28.4	N/A	230
10 ⁷ dilution	N/A	2.98	N/A	-2.17
DW	N/A	6.34	N/A	244

실시예 4. 종래 프라이머 세트와의 임상검체 비교실험

종래 알려지거나 상용화된 말라리아 검출용 프라이머 세트 또는 키트와 덴기 바이러스 검출용 프라이머 세트 또는 키트를 본원발명의 프라이머 세트와 임상검체에 대하여 비교실험하였다. 임상검체는 고려대학교 구로병원으로부터 제공받았으며, 말라리아 pf 52개, 말라리아 pv 52개, 덴기바이러스 48개, 음성 100개의 총 254개의 검체를 대상으로 실험하였다.

말라리아의 경우 상용키트 RealStar®Malaria Screen&Type PCR Kit 1.0(ALTONA) 및 선행 논문(Han ET et al, J Clin Microbiol. 2007 Aug;45(8):2521-8.)의 프라이머 세트를 대상으로 비교실험 하였으며, 덴기바이러스의 경우 상용키트 RealStar®덴기열 RT-PCR 키트 3.0(ALTONA) 및 선행특허(대한민국 등록특허 제 10-2226356호)의 프라이머 세트를 대상으로 비교실험하였다.

말라리아 pf 검체에 대한 비교실험을 표 15에, 말라리아 pv 검체에 대한 비교실험결과를 표 16에, 덴기바이러스

검체에 대한 비교실험결과를 표 17에, 음성검체에 대한 비교실험결과를 표 18에 각각 나타내었다.

[0087]

하기 표 15 및 16에서 확인할 수 있듯이, 본원발명의 멀티플렉스 LAMP 조성물은 뎅기바이러스 검출용 프라이머 세트에 대한 비특이반응 없이, 말라리아 검체 104개에 대하여 말라리아 및 내부대조군 모두 100%의 정확도로 양성을 나타내었으며, 상기한 선행논문의 말라리아 검출정확도는 92.3%, 상용키트의 내부대조군 정확도가 98%(말라리아 검출정확도 100%)인 것에 비하여 우수한 효과를 가짐을 확인할 수 있었다.

[0088]

또한 하기 표 17에서 확인할 수 있듯이, 48개의 뎅기바이러스 검체에 대하여 본원발명의 멀티플렉스 LAMP 조성물은 말라리아 프라이머세트에 대한 비특이반응 없이 뎅기바이러스 검출 정확도 89.5%, 내부대조군 검출 정확도 72.9%를 나타냈다. 이는 상용 키트의 정확도보다는 다소 낮았으나, 검출정확도 70.8%를 보여준 상기 선행특허보다는 우수한 성능을 확인할 수 있었다.

[0089]

하기 표 18에서 확인할 수 있듯이, 음성인 100개 검체에 대하여도 본원발명의 멀티플렉스 LAMP 조성물은 100%의 검출정확도(내부대조군 검출정확도 98%)를 나타내어 높은 특이도를 확인할 수 있었다.

표 15

[0090]

Samples	말라리아/뎅기바이러스 multiplex LAMP						ALTONA						선행논문(HAN ET et al.)
	Pan malaria (FAM)		Pan DENV (Cy5)		G6PD (Texas Red)		pf (FAM)		pv (Cy5)		IC (HEX)		Color detection
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	
pf 1	26.13	2887	N/A	-236	11.08	2944	25.37	9842	N/A	1.19	25.9	2364	양성
pf 2	14.23	3069	N/A	-447	10.62	2916	23.12	10416	N/A	1.83	25.55	2164	양성
pf 3	17.93	2967	N/A	-597	10.22	2876	25.03	10231	N/A	1.79	25.72	2309	양성
pf 4	12.77	1606	N/A	337	11.16	2952	20.25	10488	N/A	1.65	25.59	1094	양성
pf 5	35.88	2679	N/A	-662	10.14	3068	28.64	8683	N/A	4.06	25.79	2234	음성
pf 6	17.17	3092	N/A	427	11.27	3119	20.16	10700	N/A	1.61	25.74	927	양성
pf 7	20.26	2947	N/A	-624	10.22	3299	23.5	10480	N/A	9.32	25.54	1997	양성
pf 8	31.51	2454	N/A	-1008	10.32	3230	29.44	8555	N/A	0.206	26.09	2595	양성
pf 9	23.6	2654	N/A	-364	9.71	2854	25.47	9943	N/A	4.54	25.84	2346	양성
pf 10	22.12	2776	N/A	-426	11.12	3029	26.74	10080	N/A	3.66	26.03	2865	양성
pf 11	18.71	2624	N/A	-565	10.86	3010	20.59	10252	N/A	2.71	25.7	1050	양성
pf 12	19.44	2603	N/A	-32.2	10.44	2910	24.75	8950	N/A	220	25.87	1584	양성
pf 13	27.36	2680	N/A	-768	10.69	3113	26.85	10367	N/A	1.59	26.01	2620	양성
pf 14	18.04	2391	N/A	-788	10.34	3106	23.44	9926	N/A	3.56	25.65	1946	양성
pf 15	15.38	2601	N/A	609	10.05	3546	21.46	9996	N/A	2.14	25.6	1237	양성
pf 16	12.66	1415	N/A	-691	10.98	3038	19.48	9908	N/A	2.75	26.93	659	양성
pf 17	19.82	2535	N/A	-155	10.99	2709	23.19	9252	N/A	3.28	25.64	1651	양성
pf 18	23.3	2846	N/A	-318	10.17	2813	27.23	9986	N/A	2.55	26.16	2780	음성
pf 19	25.13	2627	N/A	-216	11.32	2728	25.22	9871	N/A	64.6	25.8	2444	양성
pf 20	17.13	2868	N/A	-644	10.07	3206	20.36	10361	N/A	1.97	25.82	973	양성
pf 21	32.35	2811	N/A	-806	10.61	3488	27.23	9890	N/A	2.5	26.05	2351	양성
pf 22	25.77	2937	N/A	-82.3	11.26	3248	23.37	9983	N/A	0.881	25.73	2035	양성
pf 23	24	3023	N/A	629	10.79	3560	21.51	10289	N/A	2.86	25.62	1326	양성
pf 24	26.97	2849	N/A	-71.1	11.28	3076	24.51	9659	N/A	3.24	25.8	2280	양성
pf 25	36.98	3501	N/A	625	11.23	4140	26.49	9274	N/A	3.81	25.93	1978	양성
pf 26	25.21	4634	N/A	-897	11.27	4677	20.3	10156	N/A	2.27	26.2	914	양성
pf 27	28.36	4920	N/A	651	11.11	4398	23	9841	N/A	2.72	25.73	1516	양성
pf 28	26.23	4411	N/A	664	10.76	4150	20.77	10057	N/A	1.36	25.72	1183	양성
pf 29	23.83	4567	N/A	413	11.62	4163	19.19	9837	N/A	2.22	30.35	508	양성
pf 30	25.15	4476	N/A	459	12.01	4013	21.39	9992	N/A	1.46	25.81	1173	양성
pf 31	32.48	4002	N/A	580	12.01	4121	26.04	9469	N/A	0.873	26.16	2151	양성
pf 32	28.68	4432	N/A	540	11.4	4309	24.36	9182	N/A	2.69	25.93	1762	양성
pf 33	29.1	4533	N/A	544	12.03	4156	27.35	8788	N/A	235	26.01	2364	양성
pf 34	22.23	5166	N/A	580	11.96	4269	19.61	10725	N/A	1.33	36.79	415	양성
pf 35	32.15	4435	N/A	564	11.32	4286	24.11	11078	N/A	1.98	26.17	1560	양성
pf 36	29.51	4493	N/A	-477	12.12	4288	22.45	11387	N/A	2.08	26.15	1256	양성
pf 37	35.2	3935	N/A	609	11.2	4324	29.56	8545	42.6	381	26.39	1823	음성

pf 38	25.59	4456	N/A	740	12.07	4228	23	9265	N/A	131	25.73	1046	양성
pf 39	35.17	4841	N/A	1079	11.72	4684	21.96	11688	N/A	6.57	26.31	1106	양성
pf 40	29.92	4262	N/A	591	11.38	4468	27.16	11090	N/A	4.45	26.18	2184	양성
pf 41	33.2	3816	N/A	496	12.09	3855	26.06	10093	N/A	-0.39	26.27	1953	양성
pf 42	26.11	4285	N/A	422	11.3	4077	20.9	10793	N/A	3.91	28.21	780	양성
pf 43	25.31	4758	N/A	494	11.77	3872	21.28	11576	N/A	3.53	26.76	1065	양성
pf 44	25.74	4347	N/A	549	12.1	4010	25.42	11365	N/A	2.27	26.16	2267	양성
pf 45	31.01	4521	N/A	647	12.13	4279	27.94	10616	N/A	1.46	26.31	2271	양성
pf 46	33.76	4202	N/A	-534	12.29	4421	25.4	10338	N/A	3.46	26.24	1985	양성
pf 47	30.6	4434	N/A	866	11.17	4552	26.08	9653	N/A	-0.628	26.37	1766	양성
pf 48	31.82	4296	N/A	742	11.38	4447	21.85	10654	N/A	3.22	26.95	956	양성
pf 49	21.07	4349	N/A	722	12.4	4127	19.73	10773	N/A	0.762	45.85	281	양성
pf 50	23.4	1367	N/A	279	13.05	2501	17.04	10744	N/A	2.45	N/A	21.1	양성
pf 51	34.04	1494	N/A	289	12.99	2678	25.99	9404	N/A	3.95	26.05	1683	음성
pf 52	29.67	1351	N/A	-741	13.07	2899	18.08	10092	N/A	2.04	N/A	68.8	양성

표 16

[0091]

	말라리아/헵기바이러스 multiplex LAMP						ALTONA						선행논문(HAN ET et al.)
Samples	Pan malaria (FAM)		Pan DENV (Cy5)		G6PD (Texas Red)		pf (FAM)		pv (Cy5)		IC (HEX)		Color detection
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	
pv 1	28.11	2642	N/A	-648	10.6	3026	N/A	8.77	30.57	4106	26.28	2137	양성
pv 2	29.22	3077	N/A	-710	11.03	3568	N/A	6.19	27.39	4060	25.85	1729	양성
pv 3	21.52	2982	N/A	-499	10.49	3153	N/A	-3.01	23.95	4905	25.79	1297	양성
pv 4	26.2	3144	N/A	-468	10.7	3301	N/A	19.7	27.18	4647	25.86	2150	양성
pv 5	19.33	2732	N/A	420	10.43	3104	N/A	9.44	28.16	4909	26.06	2401	양성
pv 6	19.66	3122	N/A	-477	10.54	3220	N/A	1.29	27.54	4740	25.99	2198	양성
pv 7	20.87	3122	N/A	-664	10.16	2997	N/A	-2.58	29.4	4522	26.27	2000	양성
pv 8	20.75	2984	N/A	-483	10.38	3047	N/A	7.85	28.44	4630	26.14	2242	양성
pv 9	26.92	2766	N/A	-554	10.21	2835	N/A	2.93	28.19	4497	26.24	1878	양성
pv 10	22.2	2908	N/A	449	10.19	2771	N/A	0.415	29.57	4600	26.24	2112	양성
pv 11	23.85	2843	N/A	-493	10.32	3044	N/A	3.88	29.13	4834	26.13	2275	양성
pv 12	24.01	2744	N/A	381	10.26	2877	N/A	3.72	27.89	4861	26.17	2118	양성
pv 13	22.77	2478	N/A	-531	10.74	2892	N/A	3.88	28.15	4794	26.21	2083	양성
pv 14	22.05	3130	N/A	-412	10.21	3050	N/A	8.89	26.21	4970	25.95	1970	양성
pv 15	18.17	2810	N/A	-876	10.13	3144	N/A	-1.8	25.73	4917	25.91	1760	양성
pv 16	21.33	2848	N/A	435	10.34	2965	N/A	-3.73	26.36	4884	26.01	2020	양성
pv 17	25.27	2763	N/A	-703	10.92	3362	N/A	7.65	29.79	4525	26.23	2291	음성
pv 18	23.91	3105	N/A	726	10.51	3486	N/A	13.2	27.1	4690	26.11	2072	양성
pv 19	25.55	2826	N/A	-519	10.35	3158	N/A	3.55	27.86	5016	26.12	2265	양성
pv 20	23.51	3202	N/A	-556	10.46	3471	N/A	-0.553	25.12	5227	25.74	1985	양성
pv 21	27.58	3049	N/A	467	11	3426	N/A	5.72	29.78	4619	26.18	2506	양성
pv 22	29.38	3019	N/A	-383	10.72	3363	N/A	4.22	28.61	4616	26.19	2107	양성
pv 23	23.65	3103	N/A	476	10.22	3086	N/A	3.65	26.88	4694	26.06	2102	양성
pv 24	24.27	3019	N/A	-549	10.31	2973	N/A	5.05	27.28	4660	26.12	2120	양성
pv 25	29.7	4553	N/A	-566	11.69	3947	N/A	3.69	27.97	4637	26.19	2060	양성
pv 26	27.15	4555	N/A	-45.6	11.42	4002	N/A	8.39	26.41	4949	26.1	1856	양성
pv 27	28.23	4807	N/A	-353	11.42	4220	N/A	1.85	27.9	4767	26.11	2238	양성
pv 28	30.97	4317	N/A	527	11.54	4223	N/A	12.6	30.03	4441	26.22	2204	음성
pv 29	28.07	4971	N/A	-499	11.44	4278	N/A	6.03	26.18	4893	25.94	2041	양성
pv 30	29.31	4944	N/A	528	11.51	4336	N/A	-4.51	29.24	4515	26.14	2214	양성
pv 31	25.15	4672	N/A	461	11.46	4074	N/A	1.82	25.96	4705	25.91	1762	양성
pv 32	26.05	5052	N/A	-455	11.46	4291	N/A	10.7	25.7	4561	26.08	1773	양성
pv 33	35.2	4273	N/A	718	11.36	4635	N/A	2.76	30.87	4262	26.35	2075	음성
pv 34	37.97	4302	N/A	787	11.37	4593	N/A	2.55	31.06	4517	26.21	2335	양성
pv 35	31.16	5350	N/A	-825	11.39	4890	N/A	13.9	28.02	4696	26.22	2165	양성

pv 36	33.68	4439	N/A	681	11.15	4440	N/A	136	30.32	4558	26.21	2188	양성
pv 37	30.71	4279	N/A	772	11.33	4285	N/A	2.02	30.16	4351	26.23	2236	양성
pv 38	33.59	5254	N/A	10.9	11.86	4603	N/A	1.18	29.05	3428	25.74	1880	음성
pv 39	29.72	4396	N/A	612	11.18	4247	N/A	2.45	28.54	4543	26.17	2194	양성
pv 40	30.09	4984	N/A	582	11.17	4272	N/A	9.08	29.21	4264	26.28	1997	양성
pv 41	22.41	5333	N/A	431	11.44	4214	N/A	3.96	25.55	4416	26.09	1634	양성
pv 42	30.2	4885	N/A	498	11.95	4012	N/A	5.66	28.19	4295	26.17	2053	양성
pv 43	24.18	4612	N/A	434	11.63	3984	N/A	12.1	25.12	4786	26.05	1620	양성
pv 44	26.16	4501	N/A	496	11.31	3956	N/A	7.72	26.15	4596	26.11	1733	양성
pv 45	29.52	4658	N/A	573	11.72	3876	N/A	7.41	27.76	4378	26.21	1912	양성
pv 46	28.35	4892	N/A	485	11.32	4085	N/A	2.57	29.05	4376	26.16	2134	양성
pv 47	31.75	4610	N/A	515	11.4	4103	N/A	1.38	29.65	4075	26.35	1896	양성
pv 48	23.5	5209	N/A	612	11.48	4266	N/A	-13.3	26.12	5173	25.78	2418	양성
pv 49	30.33	4732	N/A	670	11.36	4333	N/A	8.33	28.22	4142	26.33	1744	양성
pv 50	24.35	5111	N/A	-397	13.02	4069	N/A	9.74	26.38	4627	26.17	1844	양성
pv 51	14.61	5216	N/A	973	10.64	4113	N/A	10.2	26.48	4644	26.08	1830	양성
pv 52	33.71	1753	N/A	-99.8	22.13	2866	N/A	-2.36	25.16	4516	26.11	1385	양성

표 17

[0092]

Sample No	Multi (PAN MAL+Pan DENV+IC(G6PD) LAMP)						ALTONA(Template10ul)				선행특허	
	FAM(PAN MAL)		cy5 (Pan DENV)		TEX (IC:G6PD)		FAM		HEX (IC:JOE)		EVA green	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
1	N/A	-35.2	34.46	4923	32.2	704	28.23	8541	29.61	1375	36.64	1414
2	N/A	-28	25.87	6172	42.28	923	27.8	9142	29.55	1442	N/A	47.1
3	N/A	-31.6	20.16	6300	44.61	1105	25.4	8833	30.54	860	N/A	56
4	N/A	-31	26.04	9180	11.77	2639	27.03	8688	29.71	1316	35.36	2397
5	N/A	-42.9	32.26	6401	46.32	638	26.85	7688	30.49	971	39.73	580
6	N/A	-11.6	18.07	6892	42.53	1226	29.61	9829	29.34	1781	N/A	270
7	N/A	-7.6	40.45	7865	11.87	2974	30.15	8625	29.41	1689	N/A	383
8	N/A	-40.7	24.88	6006	40.13	892	28.15	7519	29.79	1205	N/A	163
9	N/A	-57.8	26.32	6533	37.11	772	29.5	7877	29.79	1441	N/A	20.4
10	N/A	-43.7	23.18	6437	45.35	921	28.31	7933	30.04	1219	39.1	683
11	N/A	-33.7	27.7	6151	54.38	346	24.24	9553	32.52	1295	34.67	1915
12	N/A	-39.8	24.52	6509	38.24	740	29.39	9402	29.52	1612	36.15	1646
13	N/A	151	38.08	7334	26.59	2174	26.04	12392	29.3	1291	31.67	8460
14	N/A	-129	34.2	7106	N/A	80	28.79	12055	28.94	1743	N/A	116
15	N/A	162	N/A	-48.4	28.64	2727	32.09	9952	29.16	2219	28.1	7390
16	N/A	80.7	33.13	7798	29.06	2053	25.7	10544	31.03	1208	29.11	7817
17	N/A	-18.6	51.84	1341	40.81	1034	27.17	11018	29.74	1306	27.49	6824
18	N/A	-24.8	28.37	7131	N/A	76.8	24.59	13425	31.71	1171	29.57	6732
19	N/A	-25.9	27.86	6976	N/A	75.7	27.43	12901	29.21	1670	34.25	4864
20	N/A	-14.3	21.3	6694	N/A	102	27.56	12883	29.14	1611	30.25	7500
21	N/A	191	38.5	7174	28.32	2006	30.17	14003	28.63	2373	33.62	5838
22	N/A	112	24.53	7506	31.78	1421	28.71	11976	28.74	2016	20.45	8821
23	N/A	218	34.02	7247	28.07	1958	25.05	13158	30.04	1371	36.38	3397
24	N/A	-207	44.16	6332	N/A	196	28.13	13529	28.73	1978	N/A	75.5
25	N/A	-28.6	20.94	7530	N/A	146	32.16	13444	28.66	2902	36.99	3151
26	N/A	10.7	N/A	13.4	N/A	0.393	29.09	12848	29.05	1941	N/A	1123
27	N/A	174	30.36	6879	27.76	1839	28.07	14791	28.4	2176	31.34	7302
28	N/A	154	N/A	-23.5	30.12	2427	30.95	12378	28.96	2335	34.15	5267
29	N/A	-37.5	34.78	6828	N/A	21.2	27.2	13101	28.65	1986	26.5	6156
30	N/A	-36	29.49	6721	N/A	53.4	27.62	11752	28.97	1764	33.06	6043
31	N/A	209	30.94	6888	26.63	1790	24.88	12855	31.3	1391	31.54	4467
32	N/A	-36.6	29.27	7388	N/A	89.9	25.36	13541	29.98	1581	N/A	780
33	N/A	209	38.56	6839	27.01	2021	28.11	12441	29.3	1513	N/A	390
34	N/A	170	N/A	-23.4	30.05	2686	26.04	12789	29.42	1404	29.15	8111

35	N/A	205	28.33	8060	26.6	2147	24.23	12848	31.81	1212	28.54	5867
36	N/A	158	30.09	7590	27.57	2014	27.63	11954	28.99	1664	31.26	5595
37	N/A	227	N/A	-35.8	26.79	2488	29.93	10639	29.17	1638	22.49	7071
38	N/A	160	27.93	7049	29.98	1791	31.3	11038	29.2	2016	32.09	5677
39	N/A	119	28.25	7216	33.59	1890	29.8	11694	29.31	1800	N/A	944
40	N/A	240	31.72	6863	26.69	1953	25.01	11982	33.31	1135	27.41	8287
41	N/A	65.7	26.39	7447	34.24	1634	26.31	13099	29.76	1417	28.02	6199
42	N/A	2.08	18.37	8781	34.73	740	25.35	14275	29.3	1535	18.37	9048
43	N/A	-58.4	30.79	7760	N/A	30.5	28.44	12736	29.04	1651	37.57	2557
45	N/A	-34.8	30.23	7204	N/A	67.3	27.6	13014	29.27	1504	38.87	1805
46	N/A	-70.2	42.91	4555	35.12	893	27.03	13458	29.47	1551	N/A	369
47	N/A	-34.6	24.95	7073	N/A	101	31.81	11839	29.39	2074	31.32	6377
48	N/A	35.9	25.4	7693	34.13	1399	28.58	12354	29.31	1517	N/A	310

표 18

[0093]

Sample	FAM(PAN MAL)		cy5 (Pan DENV)		TEX (IC:G6PD)	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
음성 1	N/A	-28.3	N/A	-75.3	15.03	4157
음성 2	N/A	-61.6	N/A	-443	15.38	4707
음성 3	N/A	-53.4	N/A	-524	13.7	4248
음성 4	N/A	-42.1	N/A	-97.2	17.2	4284
음성 5	N/A	-25.1	N/A	-212	14.91	3961
음성 6	N/A	-23.6	N/A	-586	14.34	4254
음성 7	N/A	-31.6	N/A	-82.3	16.45	4094
음성 8	N/A	-19.2	N/A	-167	17.48	3019
음성 9	N/A	-32	N/A	-84.4	17.12	3425
음성 10	N/A	-18.9	N/A	-79.2	18.98	3540
음성 11	N/A	-28.9	N/A	-59.7	14.26	3350
음성 12	N/A	-18.3	N/A	-106	18.27	2856
음성 13	N/A	-25.8	N/A	-89.7	17	4418
음성 14	N/A	-37.6	N/A	719	12.23	3453
음성 15	N/A	-30.4	N/A	-318	14.19	4212
음성 16	N/A	-30.6	N/A	-97.9	15.54	4347
음성 17	N/A	-1.33	N/A	-161	14.5	4100
음성 18	N/A	-15	N/A	-61.5	15.72	4120
음성 19	N/A	-30.2	N/A	-76.8	16.26	4179
음성 20	N/A	-30.8	N/A	-82.3	15.57	4333
음성 21	N/A	-44.3	N/A	-96.5	17.32	4351
음성 22	N/A	-13.9	N/A	-72.8	17.05	3769
음성 23	N/A	-37.1	N/A	-89.1	16.87	4748
음성 24	N/A	-45.3	N/A	-91	17.19	4419
음성 25	N/A	-3.89	N/A	-66.2	15.54	4102
음성 26	N/A	-25	N/A	-77.7	16.47	4245
음성 27	N/A	-46.3	N/A	-87.3	19.04	4157
음성 28	N/A	-8.93	N/A	-4.19	N/A	2.96
음성 29	N/A	-17.6	N/A	-53	16.94	3457
음성 30	N/A	-36.4	N/A	-78.3	16.1	4448
음성 31	N/A	-58.1	N/A	-95	13.66	4612
음성 32	N/A	-33.6	N/A	-50.8	14.23	4430
음성 33	N/A	-12.1	N/A	-75	16.82	4137
음성 34	N/A	-46.1	N/A	-90.9	15.94	4482
음성 35	N/A	-30.4	N/A	-72.8	18.49	4151
음성 36	N/A	-42.6	N/A	-75.3	17.26	4030
음성 37	N/A	-22.2	N/A	-70.9	15.54	4234
음성 38	N/A	-17.9	N/A	-143	13.38	4360
음성 39	N/A	-18	N/A	-182	16.15	3459

음성 40	N/A	-33.4	N/A	121	14.21	4413
음성 41	N/A	-17.1	N/A	-8.42	N/A	0.615
음성 42	N/A	-39.5	N/A	-89.9	18.45	4263
음성 43	N/A	-18.6	N/A	73.4	13.82	4200
음성 44	N/A	-42.9	N/A	-111	16.43	4316
음성 45	N/A	-36	N/A	-82.8	15.48	4489
음성 46	N/A	-28.5	N/A	-71.9	15.6	3397
음성 47	N/A	-19.2	N/A	-472	14.52	4497
음성 48	N/A	-53	N/A	459	11.28	4309
음성 49	N/A	-31.8	N/A	462	9.37	3730
음성 50	N/A	-38.9	N/A	667	12.58	4279
음성 51	N/A	-22.6	N/A	598	11.14	4263
음성 52	N/A	-32.5	N/A	623	11.09	4326
음성 53	N/A	-33	N/A	-558	12.08	4228
음성 54	N/A	-35.6	N/A	666	11.14	4540
음성 55	N/A	-15.8	N/A	-625	9.71	3461
음성 56	N/A	-44.2	N/A	827	11.25	4320
음성 57	N/A	-50.6	N/A	998	11.5	4734
음성 58	N/A	-40.5	N/A	836	12.35	4515
음성 59	N/A	-45.6	N/A	977	11.42	4670
음성 60	N/A	-47.1	N/A	965	11.11	4826
음성 61	N/A	-37.9	N/A	-415	11.46	4536
음성 62	N/A	-44.7	N/A	705	11.72	4495
음성 63	N/A	-34	N/A	732	11.48	4374
음성 64	N/A	-40.2	N/A	190	11.72	4469
음성 65	N/A	-33.9	N/A	-408	11.32	4268
음성 66	N/A	-36.5	N/A	739	11.46	4594
음성 67	N/A	-25.9	N/A	624	11.17	4402
음성 68	N/A	-19.2	N/A	569	11.43	4205
음성 69	N/A	-19.8	N/A	-462	11.69	4357
음성 70	N/A	-22	N/A	-457	11.86	4440
음성 71	N/A	-47.2	N/A	822	11.66	4459
음성 72	N/A	-37.9	N/A	722	11.36	4539
음성 73	N/A	-41.4	N/A	1004	11.44	4736
음성 74	N/A	-25.2	N/A	-672	11.45	4390
음성 75	N/A	-32.1	N/A	372	12.09	4518
음성 76	N/A	-33.1	N/A	634	12.02	4501
음성 77	N/A	-21.5	N/A	-473	11.09	4274
음성 78	N/A	-19	N/A	557	11.15	4353
음성 79	N/A	-14.5	N/A	431	10.64	3323
음성 80	N/A	-65.7	N/A	-471	11.08	4632
음성 81	N/A	-44.5	N/A	975	11.09	4843
음성 82	N/A	-45.1	N/A	814	11.39	4410
음성 83	N/A	-28.6	N/A	792	11.57	4311
음성 84	N/A	-69.1	N/A	1022	11.76	4735
음성 85	N/A	-47.5	N/A	-339	12.05	4467
음성 86	N/A	-41.2	N/A	-421	12.05	4535
음성 87	N/A	-17.4	N/A	619	11.42	4317
음성 88	N/A	-18.8	N/A	661	13.76	3003
음성 89	N/A	-26.2	N/A	740	11.35	4328
음성 90	N/A	-37.3	N/A	679	12.01	4509
음성 91	N/A	-38.3	N/A	-515	11.77	4489
음성 92	N/A	-48.4	N/A	965	11.03	4953
음성 93	N/A	-44.4	N/A	690	12.32	4505
음성 94	N/A	-33.3	N/A	627	11.82	4375
음성 95	N/A	-47.8	N/A	724	11.77	4511
음성 96	N/A	-45.1	N/A	645	11.32	3879
음성 97	N/A	-25.9	N/A	508	11.74	4085

음성 98	N/A	-28.3	N/A	495	12.27	3874
음성 99	N/A	-28	N/A	623	11.95	3704
음성 100	N/A	-9.29	N/A	567	10.69	3193

[0094]

이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0095]

그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1

