



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090145
(43) 공개일자 2023년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2527/101 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2021-0179155

(22) 출원일자 2021년12월14일
심사청구일자 2021년12월14일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

장웅식

서울특별시 동작구 여의대방로 28, 102동 108호(신대방동, 현대아파트)

임채승

경기도 안양시 동안구 동편로 135, 402동 903호(관양동, 동편마을)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 무한

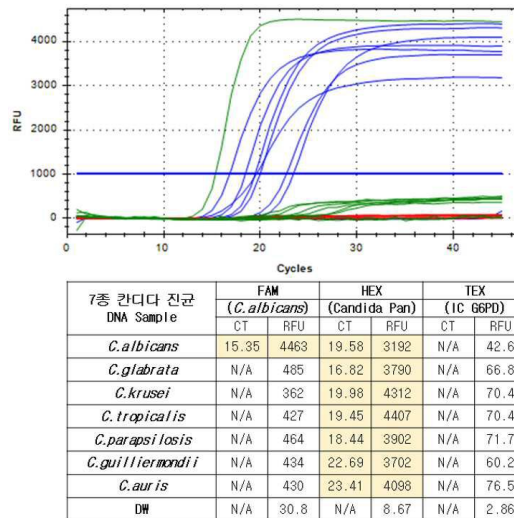
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **형광 프로브를 이용한 칸디다 판 및 칸디다 알비칸스 검출용 동시다중 등온증폭반응 프라이머 세트**

(57) 요약

본 발명은 칸디다 판(*Candida pan*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 검출을 위한 동시다중 등온증폭반응(multiplex LAMP) 프라이머 세트에 관한 것으로서, 한 번의 검사로 칸디다균 7종을 진단하고, 그 중 칸디다 알비칸스를 감별 진단할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 ITS1와 ITS2 부위를 포함한 18s-28s rRNA 유전자 서열을 기반으로 제작되어 높은 민감도와 정확도를 나타내며, 프로브의 3' 말단에 MGB 소광물질(quencher)을 추가하여 타겟 서열에 대한 민감도를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 검출 방법은 핵산 증폭 여부를 확인하기 위한 전기영동 과정이 불필요하며, 핵산 증폭 시 일정 온도에서 진행되므로 기존의 PCR법 보다 검출 시간이 짧고, 사용할 수 있는 기기의 제한이 적으므로, 기존의 진균 검출법을 대체하는 분자진단검사방법으로 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

(72) 발명자

문경철

경기도 군포시 오금로 43, 346동 105호(금정동, 을곡아파트)

임다혜

인천광역시 계양구 아나지로198번길 11, 106동 803호(효성동, 금호어울림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465033049

과제번호 HR20C0021020021

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성(R&D)

연구과제명 신종 감염병 초고속 정밀진단기술 개발 및 사업화

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 구로병원

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711147218

과제번호 2020R1A2C101176512

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 (이공)(유형1-1)중견연구(연 평균연구비 1억원 이내)

연구과제명 미세유동기법을 이용한 칸디다 혈류감염의 신속한 분자진단법 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 5의 프라이머와 서열번호 6의 프로브를 포함하고,
서열번호 7 내지 11의 프라이머와 서열번호 12의 프로브를 포함하고,
서열번호 13 내지 18의 프라이머와 서열번호 19 및 20의 프로브를 포함하는,
칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피컬리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 아우리스(*Candida auris*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 및 칸디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) 검출용 동시다중 등온증폭반응(multiplex loop-mediated isothermal amplification reaction, multiplex LAMP) 프라이머 세트로서,
상기 프라이머 세트는 칸디다 알비칸스를 감별 검출할 수 있는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 서열번호 6, 12, 및 19의 프로브는 5'말단에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 형광물질은 각각 상이한 파장을 발하는 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 형광물질은 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 써아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 5

제2항에 있어서,
상기 서열번호 6의 프로브는 5' 말단에 FAM(6-carboxyfluorescein)이 부착되었고,
상기 서열번호 12의 프로브는 5' 말단에 HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein)가

부착되었고,

상기 서열번호 19의 프로브는 5' 말단에 텍사스 레드(texas red)가 부착된 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 서열번호 6, 12, 및 20의 프로브는 각각 3'말단에 소광물질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 소광물질은 IABkFQ(Iowa black FQ quencher), IAbRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), 및 ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 동시다중 LAMP 프라이머 세트.

청구항 8

제1항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 10

(1) 생물학적 시료로부터 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;

(2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 제1항의 프라이머 세트를 이용하여 등온증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

(3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (1) 단계의 생물학적 시료는 혈액(blood), 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration), 구강세척액(oreal cavity swab), 및 소변(urine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 검출 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 (3) 단계는 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 검출 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 (3) 단계 이후, 상기 (3) 단계에서 검출하는 시간을 측정하여 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몬디를 정량화하는 단계를 추가로 포함하는, 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 형광 프로브를 이용한 칸디다 판(*Candida pan*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 검출용 동시 다중 등온증폭반응 프라이머 세트에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 패혈증은 여러 가지 병원성균이 혈액내로 침투하여 여러 장기에 감염을 일으켜 이로 인한 전신적인 염증반응을 일으키는 증후군으로 병원 내 감염 발생률이 더욱 높고, 진단이 늦어져서 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 치료 비용과 함께 사망률 급격히 증가한다. 최근 연구에 따르면 미국·영국 등 선진국은 최근 20년간 패혈증 사망률이 매년 0.9%포인트씩 감소한 반면, 한국인 패혈증 발생률은 10만명당 2008년 233명에서 2012년 347명으로 5년간 패혈증 환자가 50%가량 증가한 것으로 확인되었다.

[0004] 현재까지 보고된 바에 따르면 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 병원 내 혈류 감염의 주요 원인균이며 항진균제 치료가 늦어질수록 사망률이 높아지며, 특히 12시간 이상 지체될 경우 사망률이 급격히 증가한다. 칸디다 혈증에 의한 사망률은 40~54%로 높게 나타났다. 칸디다균 감염 환자에 대해 빠른 항진균제 치료를 위해서는 칸디다균에 대한 조기 정확한 진단이 매우 중요하다. 현재까지 혈액 배양은 여전히 칸디다혈증의 진단을 위한 최적의 표준 검사로 여겨지고 있으나, 혈액 배양 검사는 혈액내 칸디다 알비칸스가 매우 낮은 농도로 존재할 경우 배양이 쉽지 않아 양성 진단까지의 시간이 일반적으로 2~4일 소요되고 일반적으로 대략 63~83% 정도의 낮은 민감도를 나타낸다.

[0005] 이를 위해 다양한 mannan, (1-3)- β -d-glucan, PCR 등 non-culture 기반 진단법이 개발되었으나 mannan, BDG 등을 이용한 검출법은 특이도가 낮은 경우가 많이 보고되었고, PCR 방법의 경우에는 검출 특이도는 높으나 샘플 내에 진균이 낮은 농도로 존재할 경우 검출하기 힘들고, PCR 검사시간이 오랜 시간이 소요되는 단점이 있다. 따라서 혈액 내 진균 검출을 위한 빠르고 민감도 높은 PCR법을 개발한다면 칸디다균에 대한 정확한 조기진단이 가능할 것으로 예상된다.

[0006] 최근, 온도 변화 없이 일정한 온도에서 유전자를 증폭하는 등온증폭 반응법(loop-mediated isothermal amplification reaction, LAMP)이 개발되었다. 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. LAMP는 상술한 장점을 가져 감염질환에 적용된 바 있으나, 칸디다균 7종을 모두 검출하는 LAMP 검사법은 현재까지 개발된 바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 빠른 시간 내에 칸디다균 7종 진단하면서 그 중 칸디다 알비칸스를 감별 진단할 수 있는 동시다중 등온증폭반응(multiplex LAMP) 프라이머 세트를 개발함으로써 진단의 정확성을 유지하며 시간 효율을 높이는 방법을 연구하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Norihiro, T. et. al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature protocols. 2008;3:5.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피컬리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 아우리스(*Candida auris*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 및 칸디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*) 검출용 동시다중 등온증폭반응(multiplex loop-mediated isothermal amplification reaction, multiplex LAMP) 프라이머 세트, 및 이를 포함하는 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 칸디다균 7종의 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 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

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 5의 프라이머와 서열번호 6의 프로브(칸디다 판 LAMP 프라이머 세트)를 포함하고, 서열번호 7 내지 11의 프라이머와 서열번호 12의 프로브(칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트)를 포함하고, 서열번호 13 내지 18의 프라이머와 서열번호 19 및 20의 프로브(내부 대조균 LAMP 프라이머 세트)를 포함하는, 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출용 동시다중 등온증폭반응(multiplex LAMP) 프라이머 세트를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 프라이머 세트는 상기 칸디다균 7종 중 칸디다 알비칸스를 감별 검출할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 6, 12, 및 19의 프로브는 5'말단에 형광물질이 부착될 수 있다. 이때, 상기 형광물질은 각각 상이한 파장을 발하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광물질은 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(terramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디 카르보시아닌(thiadicyanin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 6의 프로브는 5' 말단에 FAM(6-carboxyfluorescein)이 부착되었

고, 상기 서열번호 12의 프로브는 5' 말단에 HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein)가 부착되었고, 상기 서열번호 19의 프로브는 5' 말단에 텍사스 레드(texas red)가 부착될 수 있다.

- [0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 7, 12, 및 20의 프로브는 각각 3'말단에 소광물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 소광물질은 IABkFQ(Iowa black FQ quencher), IABRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), 및 ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출용 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출 방법을 제공한다:
- [0028] (1) 생물학적 시료로부터 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
- [0029] (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 제1항의 프라이머 세트를 이용하여 등온증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0030] (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디 검출 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 생물학적 시료는 혈액(blood), 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration), 구강세척액(oral cavity swab), 및 소변(urine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계는 DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 형광 측정 방법에 의할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 칸디다 판 LAMP 프라이머 세트에 의해 증폭된 산물과 칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트에 의해 증폭된 산물이 모두 검출되는 경우 칸디다 알비칸스에 감염된 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 내부 대조군 LAMP 프라이머 세트에 의한 증폭산물이 검출되고 다른 프라이머 세트에 의한 증폭 산물은 검출되지 않는 경우 음성으로 해석하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 (3) 단계의 검출 시간을 측정하여 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및/또는 칸디다 구일리에르몽디를 정량화 하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 “정량화”는 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용한 증폭반응 수행 시의 표준곡선과 비교하여 DNA 농도에 따른 형광물질 검출 시간을 정량화하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 증폭 산물을 형광지표를 이용하여 검출함으로써 형광물질 검출 시간을 측정하여 DNA 농도를 정량화하는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 생물학적 시료로부터 RNA를 추출하고, 상기 RNA를 주형으로 역전사반응을 수행

하여 전체 cDNA를 합성한 후, 상기 cDNA를 주형으로 상기 칸디다 판 및 칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트를 포함하는 동시다중 LAMP 프라이머 세트를 이용하여 등온증폭반응을 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 칸디다 판(*Candida pan*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 검출을 위한 동시다중 등온증폭반응(multiplex LAMP) 프라이머 세트에 관한 것으로서, 한 번의 검사로 칸디다균 7종을 진단하고, 그 중 칸디다 알비칸스를 감별 진단할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 ITS1와 ITS2 부위를 포함한 18S-28S rRNA 유전자 서열을 기반으로 제작되어 높은 민감도와 정확도를 나타내며, 프로브의 3'말단에 MGB 소광물질(quencher)을 추가하여 타겟 서열에 대한 민감도를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 검출 방법은 핵산 증폭 여부를 확인하기 위한 전기영동 과정이 불필요하며, 핵산 증폭 시 일정 온도에서 진행되므로 기존의 PCR법 보다 검출 시간이 짧고, 사용할 수 있는 기기의 제한이 적으므로, 기존의 진균 검출법을 대체하는 분자진단검사방법으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 칸디다 판(*Candida pan*)의 타겟 유전자인 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 서열에서 등온증폭반응(LAMP) 프라이머 세트의 위치를 나타낸 것이다.

도 2는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)의 타겟 유전자인 5.8S rRNA-ITS2-28S rRNA 서열에서 LAMP 프라이머 세트의 위치를 나타낸 것이다.

도 3은 칸디다 판(*Candida pan*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 및 내부 대조군(internal control)의 LAMP 프라이머 세트를 이용하여 칸디다균 7종(칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피컬리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 아우리스(*Candida auris*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*))와 증류수(D.W)를 대상으로 칸디다균 동시다중 등온증폭(multiplex LAMP) 프라이머 세트의 검출 테스트 결과를 나타낸 것이다. 이 때, 상기 프라이머 세트의 형광물질로 각각 FAM(칸디다 알비칸스), HEX(칸디다 판), 및 Texas RED(내부 대조군)을 이용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명자들은 칸디다균의 감염 여부를 신속하고 정확하게 감별 및 진단하는 방법에 대해 연구하여 본 발명을 완성하였다.

[0042] 구체적으로, 본 발명은 칸디다균 7종 (칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 칸디다 트로피컬리스(*Candida tropicalis*), 칸디다 아우리스(*Candida auris*), 칸디다 글라브라타(*Candida glabrata*), 칸디다 크루세이(*Candida krusei*), 칸디다 파라프실로시스(*Candida parapsilosis*), 칸디다 구일리에르몽디(*Candida guilliermondii*))에 의한 칸디다균 감염을 진단하면서 주요 원인균인 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)을 감별 검출할 수 있도록 칸디다균의 18S rRNA-internal spacer1-5.8S rRNA-internal spacer2-28S rRNA 서열위치에서 유사 유전자를 바탕으로는 칸디다균 7종을 진단할 수 있는 칸디다 판(*Candida pan*) 프라이머를, 특이 유전자 서열을 바탕으로는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 진단할 수 있는 칸디다 알비칸스 프라이머를 디자인하였다.

[0043] 또한 본 발명은 기존의 일반 PCR법으로 발생될 수 있는 결과 분석의 에러와 소요 시간을 줄이기 위해서 내부 대조군으로서 G6PD 프라이머 세트를 포함함으로써 한 튜브 안에서 칸디다균 검출 및 허위 음성 판정이 가능하다.

[0044] 이를 바탕으로, 본 발명은 내부 대조군을 추가하여 ① 상기 칸디다균 7종에 모두 결합하는 LAMP 프라이머 세트(*Candida pan* LAMP primer/probe), ② 칸디다 알비칸스에 특이적으로 작용하는 LAMP 프라이머 세트(*C. albicans* LAMP primer/probe), 및 ③ 내부 대조군에 작용하는 LAMP 프라이머 세트(internal control LAMP primer/probe)로 구성된 동시다중 등온증폭반응(multiplex LAMP) 프라이머 세트를 제공한다.

[0045] 하기 표 1의 서열번호 1 내지 6은 상기 칸디다균 7종을 검출하기 위한 5개의 프라이머와 1개의 프로브를 포함하는 프라이머 세트(①), 서열번호 7 내지 12는 칸디다 알비칸스를 검출하기 위한 5개의 프라이머와 1개의 프로브

를 포함하는 프라이머 세트(②), 및 서열번호 13 내지 20은 내부 대조군(G6PD)을 위한 6개의 프라이머와 2개의 프로브를 포함하는 프라이머 세트(③)이다. 표 1의 프라이머 세트 및 이를 포함하는 조성물(표 2)은 동시다중 등온증폭(multiplex LAMP)법을 이용한 칸디다균 7종 및 칸디다 알비칸스의 감별 검출에 이용될 수 있다.

[0046] 구체적으로, 칸디다 판 LAMP 프라이머 세트(①) 및 칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트(②)의 프로브의 경우, 등온증폭반응(LAMP) 시 순간적으로 단일 가닥(single strand)에 노출되는 루프에 결합하여 형광물질과 소광물질의 사이가 벌어져 형광을 나타내는 반면, 내부 대조군 LAMP 프라이머 세트(③)의 프로브의 경우, 형광이 결합된 인공서열(32mer)을 LB 프라이머의 5'말단에 결합하여 제작하였다. 등온증폭반응(LAMP) 전에는 인공서열에 상보적인 P4_quencher(30mer) 프로브가 결합되어 형광이 억제되고, 등온증폭반응이 일어나면 증폭되면서 결합되어 있던 P4_quencher가 상기 프로브에서 떨어지면서 형광이 나타난다.

[0047] 본 발명은 종래에 PCR법, real time PCR법 검출 기반으로 하는 것과 달리, 동시다중 실시간 등온증폭법(Multiplex real-time LAMP)을 기반으로 프라이머 세트를 제작하여 칸디다균 7종을 동시에 검출함으로써 Real-time PCR법과 conventional PCR법에 비해 시간을 단축할 수 있다. 또한, 다중진단으로 검사할 수 있어 한 번에 칸디다균 7종 중 칸디다 알비칸스를 구별하여 검출할 수 있다는 점에서 기존의 LAMP법과 비교하였을 때도 비용과 검사시간을 단축할 수 있다.

[0049] 본 발명에서, 용어 “검출”이란 미생물의 존재 유무의 판별 또는 상대적 미생물 양의 정도, 또는 미생물 감염 위치의 판별을 의미하는 것으로, 상기 미생물은 단일 세포, 세포 클러스터 또는 다세포 유기체를 포함하는 미시적인 유기체를 지칭하며, 구체적으로 바이러스, 진균(곰팡이, fungi), 원생동물(protozoa), 세균(박테리아, bacteria) 등을 의미한다.

[0050] 본 발명에서, 용어 “감별”이란, 특정 미생물을 구별 또는 판별하는 것을 말하며, 특히 유사한 특징을 일부 공유하는 미생물 가운데 어떤 미생물에 감염되었는지를 정확하게 구별해낸다는 의미에서, 본 발명에서는 “감별 검출한다”는 용어를 사용하였다.

[0051] 본 발명에서, 용어 “등온증폭반응(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)”은 기존 PCR법과 달리 PCR 사이클이 필요없는 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 증폭유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 있어서, “실시간 다중 등온증폭반응(real time LAMP)”은 증폭유무를 실시간으로 확인하는 방법으로서, 다양한 유전자를 동시에 검출할 수 있으며, 바람직하게는 실시간으로 시료에서 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및/또는 칸디다 구일리에르몽디를 동시에 검출 및 판별할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 프라이머 세트는 등온증폭반응(LAMP)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 조합을 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 용어, "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.

[0054] 본 발명에서, 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0055] 상기 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 써아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine) 등이 있다. 본 발명에 있어서, 칸디다 판, 칸디다 알비칸스, 및 내부 대조균에 대한 LAMP 프라이머 세트의 프로브는 각각 FAM, Hex 및 Texas RED로 표시하여 하나의 튜브 안에서 칸디다균 3종을 동시에 검출할 수 있다.

[0056] 상기 프로브에 소광물질(퀀처, quencher)이 부착될 수 있으며, 상기 소광물질은 IABkFQ(Iowa black FQ quencher), IABRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher; BHQ-1, BHQ-2 등), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), 또는 ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)일 수 있으나, 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 소광물질이 사용될 수 있다. 본 발명에서는 칸디다 판 및 칸디다 알비칸스에 대한 LAMP 프라이머 세트의 프로브 3말단은 MGB 소광물질(quencher)을 추가하여 민감도를 증가시킬 수 있다.

[0057] 본 발명에서, 용어 “생물학적 시료”는 혈액(blood), 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration), 구강세척액(oral cavity swab), 소변(urine) 등을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직을 포함할 수 있다.

[0059] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 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.

[0060] 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.

[0062] 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.

[0063] 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.

[0065] [실시예]

[0066] 실시예 1. 칸디다 7종, 칸디다 알비칸 검출용 LAMP 프라이머 세트, 중합효소연쇄반응 혼합물 조성 및 반응 조건

[0067] 칸디다균 7종(칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디)의 5.8s rRNA 유전자의 염기서열을 바탕으로 디자인된 칸디다 판(*Candida Pan*) LAMP 프라이머 세트(도 1), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) 5.8s rRNA 유전자의 염기서열을 바탕으로 디자인된 칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트(도 2) 및 내부 대조균(G6PD) 유전자의 염기서열을 바탕으로 디자인된 내부 대조균 LAMP 프라이머 세트를 표 1에 나타내었다. 이 때, 형광물질 및 소광물질은 볼드체로 표시하였고, 내부 대조균 LAMP 프라이머 세트의 프로브를 구성하는 인공서열은 밑줄로 표시하였다. RT-LAMP 프라이머 혼합물의 조성은 표 2에, RT-LAMP 반응 혼합물의 시약 조성은 표 3에, RT-LAMP 반응 조건은

표 4에 나타내었다.

표 1

서열번호	Target gene	Name	Sequence (5'-3')
1	Candida Pan LAMP primer set (5.8s rRNA gene)	C.Pan_F3	AAA ACT TTC AAC AAY GG
2		C.Pan_B3	GAM AYS ACG CTC AAA CAG
3		C.Pan_FIP	CTG CAA KTC AYT YTA SKT ATC TTT TCT CTT GGT TCT CGC ATC GA
4		C.Pan_BIP	GTG AAT CAT CGA RTY YTT TTT TGC ATG CCY YBB GGA ATR CC
5		C.Pan_FLP	CAT TTC GCT GCG YTC TTC
6		C.Pan_BLP_HEX_MGB	Hex - GAA CGC ACA TTG CGC C - MGB
7	Candida albicans LAMP primer set (5.8s rRNA gene)	c.albicans_F3	GCT GGG TTT GGT GTT GAG CA
8		c.albicans_B3	ATG CTT AAG TTC AGC GGG T
9		c.albicans_FIP	TTA GAC CTA AGC CAT TGT CTT TTG ACT TGG GTT TGC TTG A
10		c.albicans_BIP	ATT GCT TGC GGC GGT AAC GTT TTT TCC TAC CTG ATT TGA GGT CA
11		c.albicans_LB	TAC CAC GTA TAT CTT CAA
12		C.al_LF_FAM_MGB	FAM - GCG ATC CCG CCT TAC CA - MGB
13	Internal control LAMP primer set (G6PD gene)	IC_G6PD_F3	TGT CAC CAG CAA CAT CTC GA
14		IC_G6PD_B3	TCC TCA GGG AAG CAA ATG AC
15		IC_G6PD_FIP	ATA GCA GAG AGG CTG CCT ACG GTT TTG ATG TCC CCT GTC CCA CCA
16		IC_G6PD_BIP	AAG AAA AGC AGA CGC AGC AGC TTT TTG GGG CTG TTT GCG GAT T
17		IC_G6PD_LF	GGG GTG GCC ATG GAG TGC
18		IC_G6PD_LB	TCC CAA CCT CAA TGC CCT GC
19		IC_G6PD_LB_P4_TEX	TEX-CGG GCC CGT ACA AAG GGA ACA CCC ACA CTC CGT CCC AAC CTC AAT GCC CTG C
20		P4_quencher	GAG TGT GGG TGT TCC CTT TGT ACG GGC CCG-BHQ2

표 2

Candida Pan LAMP primer	μ M	C. albicans LAMP primer	μ M	Internal control LAMP primer	μ M
C.Pan_F3	4	c.albicans_F3	4	IC_G6PD_F3	4
C.Pan_B3	4	c.albicans_B3	4	IC_G6PD_B3	4
C.Pan_FIP	32	c.albicans_FIP	32	IC_G6PD_FIP	32
C.Pan_BIP	32	c.albicans_BIP	32	IC_G6PD_BIP	32
C.Pan_FLP	10	c.albicans_LB	8	IC_G6PD_LF	10
C.Pan_BLP_HEX_MGB	10	C.al_LF_FAM_MGB	12	IC_G6PD_LB	6
				IC_G6PD_LB_P4_TEX	4

표 3

구분	부피
RM	12.5
EM	2
Distilled water	5
Primer mix	2 (Candida Pan)
	1 (Candida albicans)
	0.2 (Internal control)
P4_quencher	0.3

Template	2
TOTAL	25

표 4

실험 1. 원스텝 RT-LAMP검출실험		
온도	반응시간	
58 ℃	1분	45 Cycle
전체반응시간	45분	

실시예 2. 다양한 칸디다균에 대한 칸디다균 LAMP 프라이머 세트의 특이도 테스트

칸디다균 7종(칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피컬리스, 칸디다 아우리스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 칸디다 파라프실로시스, 및 칸디다 구일리에르몽디)을 대상으로 칸디다 판 및 칸디다 알비칸스 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트의 성능을 평가하였다. 그 결과, 상기 프라이머 세트는 상기 칸디다 7종을 모두 검출하는 동시에 칸디다 알비칸스만 특이적으로 감별 검출하였다(표 5, 도 3).

표 5

Samples	Candida albicans (FAM)		Candida Pan (Hex)		Internal control (Texas Red)	
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU
<i>C. albicans</i> DNA	15.35	4463	19.58	3192	N/A	42.6
<i>C. glabrata</i> DNA	N/A	485	16.82	3790	N/A	66.8
<i>C. krusei</i> DNA	N/A	362	19.98	4312	N/A	70.4
<i>C. tropicalis</i> DNA	N/A	427	19.45	4407	N/A	70.4
<i>C. parapsilosis</i> DNA	N/A	464	18.44	3902	N/A	71.7
<i>C. guilliermondii</i> DNA	N/A	434	22.69	3702	N/A	60.2
<i>C. auris</i> DNA	N/A	430	23.41	4098	N/A	76.5
DW	N/A	30.8	N/A	8.67	N/A	2.86

실시예 3. 칸디다균 LAMP 프라이머 세트의 민감도 테스트

칸디다 알비칸스(*C. albicans*) 세포를 배양하여 1×10^8 cell/ml의 농도부터 1×10^0 cell/ml까지 희석 후 추출한 DNA 샘플로 칸디다 판 단일진단(monoplex), 칸디다 알비칸스 단일진단, 칸디다 판 및 칸디다 알비칸스 다중진단(multiplex) LAMP 프라이머 세트의 민감도를 비교하였다(표 6, 표 7). 칸디다 알비칸스에 대해서 칸디다 판 프라이머 세트의 경우, 단일진단 프라이머 세트는 1×10^4 cell/ml, 다중진단 프라이머 세트는 1×10^3 cell/ml까지 검출하였다. 칸디다 알비칸스 프라이머 세트의 경우, 단일진단 프라이머 세트와 다중진단 프라이머 세트 모두 1×10^3 cell/ml까지 검출하였다.

표 6

<i>C. albicans</i> DNA (Cell/mL)	Candida Pan Monoplex LAMP		Candida Pan/Candida albicans multiplex LAMP					
			Candida albicans (FAM)		Candida Pan (Hex)		Internal control (Texas Red)	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
10^7 cell/mL	25.46	4647	13.75	9211	20.74	1956	N/A	-2.12
10^6 cell/mL	30	4753	15.81	9664	23.07	1771	N/A	-1.38
10^5 cell/mL	32.17	4915	17.05	10075	24.73	1635	N/A	0.781

10 ⁴ cell/mL	38.6	3520	21.11	9542	29.2	1466	N/A	4.94
10 ³ cell/mL	N/A	24.8	27.43	9160	36.57	1286	N/A	15.5
10 ² cell/mL	N/A	24.7	N/A	78	N/A	31.3	N/A	3.91
10 ¹ cell/mL	N/A	24	N/A	73.3	N/A	17	N/A	3.55
10 ⁰ cell/mL	N/A	22.5	N/A	282	N/A	456	N/A	10.2
Human whole blood DNA	N/A	17.5	N/A	85.4	N/A	31.4	26.1	3165
DW	N/A	15.8	N/A	94	N/A	28.7	N/A	3.58

표 7

<i>C. albicans</i> DNA (Cell/mL)	<i>C. albicans</i> Monoplex LAMP		Candida Pan/Candida albicans multiplex LAMP					
			Candida albicans (FAM)		Candida Pan (Hex)		Internal control (Texas Red)	
			CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
10 ⁷ cell/mL	9.51	9224	13.75	9211	20.74	1956	N/A	-2.12
10 ⁶ cell/mL	10.93	11819	15.81	9664	23.07	1771	N/A	-1.38
10 ⁵ cell/mL	11.77	12360	17.05	10075	24.73	1635	N/A	0.781
10 ⁴ cell/mL	13.6	13829	21.11	9542	29.2	1466	N/A	4.94
10 ³ cell/mL	16.92	12066	27.43	9160	36.57	1286	N/A	15.5
10 ² cell/mL	N/A	114	N/A	78	N/A	31.3	N/A	3.91
10 ¹ cell/mL	N/A	106	N/A	73.3	N/A	17	N/A	3.55
10 ⁰ cell/mL	N/A	106	N/A	282	N/A	456	N/A	10.2
Human whole blood DNA	N/A	109	N/A	85.4	N/A	31.4	26.1	3165
DW	N/A	103	N/A	94	N/A	28.7	N/A	3.58

실시예 4. 임상시료에 대한 칸디다 진단 키트 효능 검증 결과

총 10개의 칸디다 임상 양성샘플(칸디다 알비칸스 4개, 칸디다 글라브라타 2개, 칸디다 트로피컬리스 2개, 칸디다 파라프실로시스 2개)을 대상으로 실시한 성능평가 실험에서 상기 10개의 칸디다 샘플은 내부 대조균을 포함하여 모두 40분 이내에 증폭이 확인되었고(표 8), 10개의 칸디다 음성샘플에 대해서 칸디다 판 LAMP 프라이머 세트 및 칸디다 알비칸스 LAMP 프라이머 세트는 모두 음성으로 확인되었고 내부 대조균은 Ct 값 30 부근에서 모두 확인되었다(표 9).

표 8

칸디다 양성 검체 수		Candida Pan/Candida albicans multiplex LAMP					
		Candida albicans (FAM)		Candida Pan (Hex)		Internal control (Texas Red)	
		CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
1	<i>C. albicans</i>	19.33	6788	26.43	1716	29.1	2989
2	<i>C. albicans</i>	21.85	6851	28.49	1697	37.88	1902
3	<i>C. albicans</i>	17.78	6614	24.82	1635	38.14	1986
4	<i>C. albicans</i>	16.45	6264	23.4	1681	38.83	1934
5	<i>C. glabrata</i>	N/A	226	27.11	4162	28.27	2919
6	<i>C. glabrata</i>	N/A	283	29.51	4198	27.49	3014
7	<i>C. tropicalis</i>	N/A	344	29.24	4186	27.01	3008
8	<i>C. tropicalis</i>	N/A	399	30.57	4539	32.19	2707
9	<i>C. parapsilosis</i>	N/A	435	34.39	3808	32.84	2672

10	<i>C. parapsilosis</i>	N/A	398	35.08	3673	29.81	3013
----	------------------------	-----	-----	-------	------	-------	------

표 9

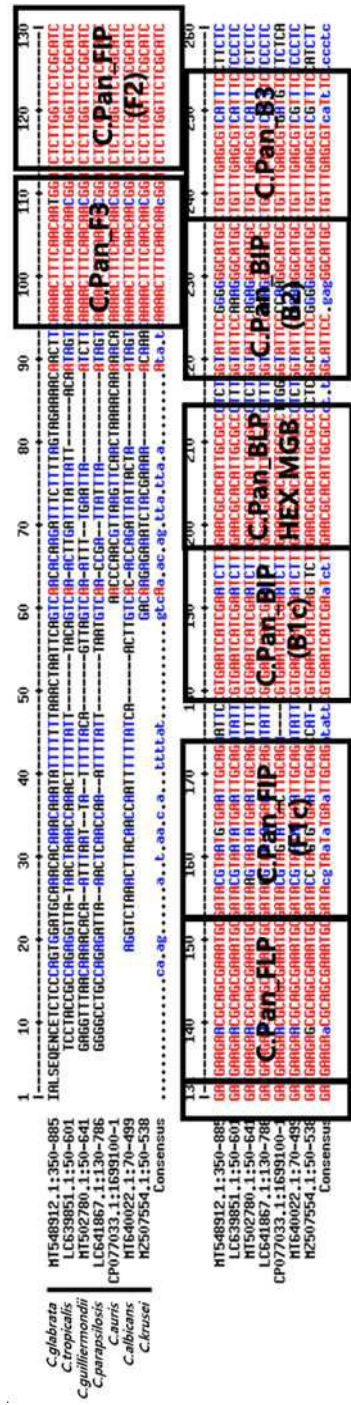
칸디다 음성 검체 수	Candida Pan/Candida albicans multiplex LAMP					
	Candida albicans (FAM)		Candida Pan (Hex)		Internal control (Texas Red)	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
1	N/A	105	N/A	35.4	26.96	2279
2	N/A	95.4	N/A	36.4	27.24	2412
3	N/A	62.4	N/A	21.5	26.88	2576
4	N/A	102	N/A	36.6	28.17	2530
5	N/A	90.2	N/A	28.2	26.48	2695
6	N/A	90.2	N/A	35.1	27.49	2678
7	N/A	77.8	N/A	30.9	27.95	2866
8	N/A	83.1	N/A	38.9	28.44	2752
9	N/A	323	N/A	435	29.34	2265
10	N/A	71	N/A	38.5	29.44	2658

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.

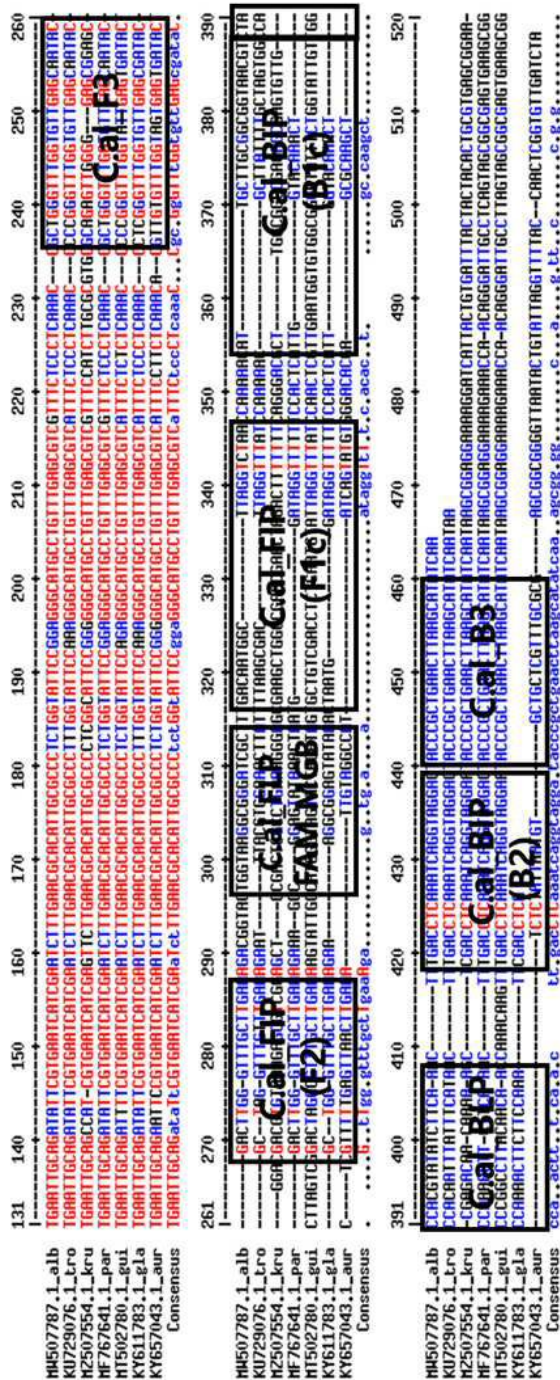
그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

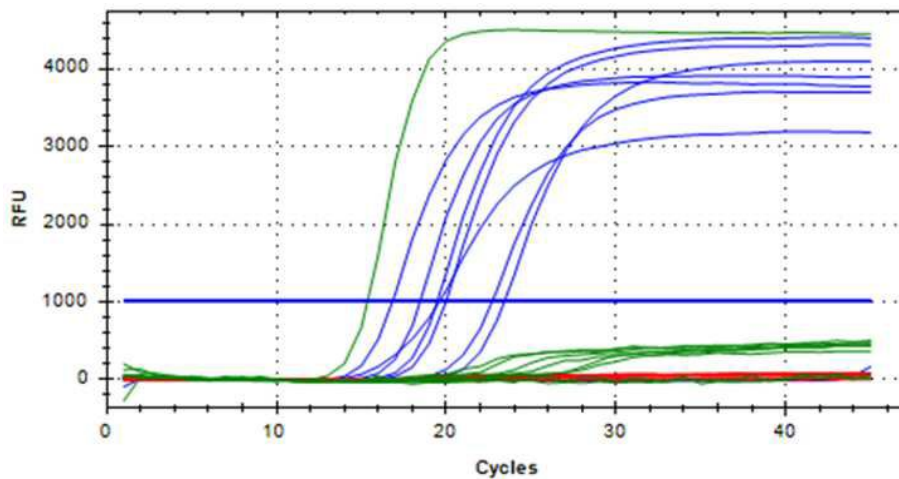
도면1



도면2



도면3



7종 칸디다 진균 DNA Sample	FAM (<i>C. albicans</i>)		HEX (Candida Pan)		TEX (IC 66PD)	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
<i>C. albicans</i>	15.35	4463	19.58	3192	N/A	42.6
<i>C. glabrata</i>	N/A	485	16.82	3790	N/A	66.8
<i>C. krusei</i>	N/A	362	19.98	4312	N/A	70.4
<i>C. tropicalis</i>	N/A	427	19.45	4407	N/A	70.4
<i>C. parapsilosis</i>	N/A	464	18.44	3902	N/A	71.7
<i>C. guilliermondii</i>	N/A	434	22.69	3702	N/A	60.2
<i>C. auris</i>	N/A	430	23.41	4098	N/A	76.5
DW	N/A	30.8	N/A	8.67	N/A	2.86

서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Primer set for multiplex loop-mediated isothermal amplification
reaction for detection of Candida pan and Candida albicans
- <130> DP-2021-0777, APC-2021-0825
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 17
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Candida Pan_F3
- <400> 1
- aaaactttca acaaygg
- <210> 2

<211> 18

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida Pan_B3

<400> 2

gamaysacgc tcaaacag 18

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida Pan_FIP

<400> 3

ctgcaaktca ytytasktat cttttctctt ggttctcgca tcga 44

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida Pan_BIP

<400> 4

gtgaatcatc gartyytttt ttgcatgccy ybbggaatrc c 41

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida Pan_FLP

<400> 5

catttcgctg cgytcttc 18

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida Pan_BLP

<400> 6

gaacgcacat tgcgcc	16
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Candida albicans_F3	
<400> 7	
gctgggtttg gtgttgagca	20
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Candida albicans_B3	
<400> 8	
atgcttaagt tcagcgggt	19
<210> 9	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Candida albicans_FIP	
<400> 9	
ttagacctaa gccattgtct ttgacttgg gtttgcttga	40
<210> 10	
<211> 44	
<212>	
> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Candida albicans_BIP	
<400> 10	
attgcttgcg gcggtaacgt ttttctctac ctgatttgag gtca	44
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Candida albicans_LB

<400> 11

taccacgtat atcttcaa 18

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Candida albicans_LF

<400> 12

gcgatcccg cttacca 17

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_F3

<400> 13

tgtcaccagc aacatctcga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_B3

<400> 14

tcctcaggga agcaaatgac 20

<210> 15

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_FIP

<400> 15

atagcagaga ggctgcctac ggttttgatg tcccctgtcc cacca 45

<210> 16

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_BIP

<400> 16

aagaaaagca gacgcagcag ctttttgggg ctgtttgcgg att 43

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_LF

<400> 17

ggggtggcca tggagtgc 18

<210>

> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_LB

<400> 18

tcccaacctc aatgccctgc 20

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_LB_P4

<400> 19

cgggcccgtg caaagggaac acccacactc cgtcccaacc tcaatgcct gc 52

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Internal control_G6PD_P4

<400> 20

gagtgtgggt gttccctttg tacgggcccg 30