



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월16일
 (11) 등록번호 10-1878529
 (24) 등록일자 2018년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12Q 1/68 (2018.01) G01N 33/53 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0128296
 (22) 출원일자 2014년09월25일
 심사청구일자 2014년09월25일
 (65) 공개번호 10-2016-0036727
 (43) 공개일자 2016년04월05일
 (56) 선행기술조사문헌
 US7888075 B2
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
 울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
 서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
 (72) 발명자
정진용
 경기도 성남시 분당구 중앙공원로 54 225동 1402호 (서현동, 시범단지우성아파트)
김양수
 서울특별시 성동구 독서당로 218, 104동 901호(옥수삼성아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 클론타입 판별용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 판별용 키트**

(57) 요약

본 발명은 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입 및 ST72 클론타입 판별용 바이오마커 조성물 및 판별 키트에 관한 것으로, 상세하게는 본 발명은 마이크로어레이 분석을 통하여 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 균주 중 ST5 및 ST72에서 특이적으로 발현 증감을 나타내는 유전자군을 선별하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)의 클론타입 확인을 위한 판별용 바이오마커 조성물 및 판별용 키트에 관한 것으로,

본 발명의 바이오마커 조성물 및 키트를 이용하면 상기 클론 타입에 따른 발현차이를 나타내는 유전자군의 조합을 통하여 한번에 hVISA 여부 진단 및 클론 타입을 결정할 수 있어 임상적으로 간편하고 유효성 있는 판별방법 및 판별용 키트 제작에 사용될 수 있다.

(72) 발명자

정용필

서울특별시 강동구 풍성로 114-1, 101동 1507호(성내동, 성안마을 청구아파트)

박수진

서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 101동 206호(목동, 한신청구아파트)

김희승

서울특별시 광진구 구의로4길 12-4 (구의동)

김소영

서울특별시 강동구 양재대로 1656, 206동 803호 (명일동, 삼익그린맨션)

김은실

서울특별시 서초구 청계산로 7길 43, 501동 706호(신원동, 서초포레스타5단지)

(56) 선행기술조사문헌

US5702895 A

Antimicrob Agents Chemother. 2005 Aug;49(8):3404-13

PLoS One. 2013 Jun 28;8(6):e66880

J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):1040-8

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI12C0872(A120964)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균의 특성

기여율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8A(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A)(GenBank accession ID NP_644939.1), 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8B(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8B)(GenBank accession ID NP_644940.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1) 및 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1)으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 바이오마커 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 바이오마커 조성물은 우레아제 약제사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 무레인 가수분해효소 조절자 LrgA(murein hydrolase regulator LrgA)(GenBank accession ID: NP_645053.1), 안티홀린 유사 단백질 LrgB(antiholin-like protein LrgB)(GenBank accession ID: NP_645054.1), 티아민 포스페이트 피로가인산분해효소 ThiE(thiamine-phosphate pyrophosphorylase ThiE)(GenBank accession ID: NP_646831.1), 하이드록시에틸티아졸 키나아제 ThiM(hydroxyethylthiazole kinase ThiM)(GenBank accession ID: NP_646832.1), 포스포메틸피리미딘 키나아제 ThiD(phosphomethylpyrimidine kinase ThiD)(GenBank accession ID: NP_646833.1), 카바메이트 키나아제(carbamate kinase; arcC)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter; arcD)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 오르니틴 카바모일전이효소(ornithine carbamoyltransferase; arcB)(GenBank accession ID: NP_647372.1), 아르기닌 디아미나아제(arginine deiminase; arcA)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2C(oligopeptide transporter permease 2C; opp-2C)(GenBank accession ID: NP_646086.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2B(oligopeptide transporter permease 2B; opp-2B)(GenBank accession ID: NP_646087.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 A 전구체(IgG binding protein A precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), sdrE(Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645335.1) 및 포도알균 혈액응고효소 전구체(staphylocoagulase precursor)(GenBank accession ID: NP_645021.1)으로 이루어진 균에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 더 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 바이오마커 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8A(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A)(GenBank accession ID NP_644939.1), 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8B(capsular polysaccharide

biosynthesis protein Cap8B)(GenBank accession ID NP_644940.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1) 또는 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1)에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드, 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 키트.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 구별용 키트는 우레아제 약제사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 무레인 가수분해효소 조절자 LrgA(murein hydrolase regulator LrgA)(GenBank accession ID: NP_645053.1), 안티홀린 유사 단백질 LrgB(antiholin-like protein LrgB)(GenBank accession ID: NP_645054.1), 티아민 포스페이트 피로가인산분해효소 ThiE(thiamine-phosphate pyrophosphorylase ThiE)(GenBank accession ID: NP_646831.1), 하이드록시에틸티아졸 키나아제 ThiM(hydroxyethylthiazole kinase ThiM)(GenBank accession ID: NP_646832.1), 포스포메틸피리미딘 키나아제 ThiD(phosphomethylpyrimidine kinase ThiD)(GenBank accession ID: NP_646833.1), 카바메이트 키나아제(carbamate kinase; arcC)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/oirnithine antiporter; arcD)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 오르니틴 카바모일전이효소(oirnithine carbamoyltransferase; arcB)(GenBank accession ID: NP_647372.1), 아르기닌 디이미나아제(arginine deiminase; arcA)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2C(oligopeptide transporter permease 2C; opp-2C)(GenBank accession ID: NP_646086.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2B(oligopeptide transporter permease 2B; opp-2B)(GenBank accession ID: NP_646087.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 A 전구체(IgG binding protein A precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), sdrE(Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645335.1) 및 포도알균 혈액응고효소 전구체(staphylocoagulase precursor)(GenBank accession ID: NP_645021.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드, 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 추가로 더 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 키트.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)에서 반코마이신(vancomycin) 불균질 내성 유발에 의하여 발현에 차이를 보이는 유전자군을 확보하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균의 클론 타입 판별용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 판별용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 황색포도알균 (*Staphylococcus aureus*)은 지역사회 감염 및 의료기관 관련 감염의 가장 흔한 원인 세균으로 감염을 일으키는 황색포도알균의 60%는 MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*)이며, MRSA 감염의 치료에는 반코마이신이 일차적으로 사용되고 있다. 그러나, 반코마이신 사용이 증가하면서, 최근 반코마이신에 감수성이 저하된 MRSA가 꾸준히 늘고 있는 양상이며, 반코마이신 내성도 크게 증가하고 있다.
- [0003] 반코마이신 내성의 종류에는 VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*: vancomycin MIC $\geq 16 \mu\text{g/mL}$), VISA (vancomycin-intermediate *S. aureus*: vancomycin MIC 4 to $8 \mu\text{g/mL}$), hVISA (heteroresistant VISA, 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균)의 세가지 유형이 존재한다. VRSA는 드물고, VISA도 빈도가 매우 낮아서 문제가 되지는 않지만 hVISA는 빈도가 높고, 이러한 균주를 신속하고 정확하게 찾아내는 방법이 없어 치료에 어려움을 겪고 있다. hVISA는 VSSA 사이에 드문 빈도 (보통 $1/10^5 \sim 10^6$)로 VISA에 속하는 subpopulation이 섞여 있는 경우를 의미하며, 반코마이신 감수성 검사를 하면 실제로는 내성이지만, 마치 반코마이신에 감수성이 있는 것처럼 나타난다. 따라서 항생제 감수성 검사 방법만으로는 hVISA인지 알 수 없다.
- [0004] 항생제 내성 병원균의 진단은 거의 배양검사에 의존하고 있어, 결과를 알 때까지 최소한 2-3일이 소요되고 감염증이 있어도 음성인 경우가 자주 나타난다. 이러한 배양검사의 단점을 극복하기 위하여 발색 배지를 이용한 BBL CHROMagar MRSA가 개발되어 24~48시간 내에 대부분의 MRSA를 확인할 수 있지만 여전히 확인까지 긴 시간이 걸린다는 문제점이 있다. 또한 hVISA 표준진단법도 많은 시간과 인력이 필요한 단점이 있어서 임상에서 적용하기가 어려워 빠른 시간내 hVISA를 확진할 수 있는 방법이 요구된다.
- [0005] 23개국의 연구기관, 지역, 국가 및 시기별로 다양한 hVISA의 빈도 및 클론 타입이 보고된 바 있으며, hVISA는 지역별, 국가별 차이를 반영한 연구가 이루어져야 함을 나타낸다. 따라서, 본 연구자들의 연구결과, 국내에서 분리된 hVISA의 균주는 의료기관 감염에서 흔히 볼 수 있는 ST5 클론타입이 80% 이상이었고, 그 다음으로 지역사회 감염에서 나타나는 ST72 클론타입으로 나타났다.
- [0006] 따라서, 본 연구자들은 동일한 환자에서 분리한 균주 중 반코마이신 감수성과 hVISA를 선별하였고, 마이크로어레이 분석을 통하여 hVISA에 특이적으로 발현 증감을 나타내는 유전자군을 선별하여, 이를 hVISA 확진에 이용할 바이오 마커 조성물로 이용하고자 한다.
- [0007] 한편, 한국공개특허 10-2001-0022777호는 반코마이신 내성균 선별을 위한 유전형 분석키트에 관한 것으로서, 반코마이신에 대한 내성을 가지는 균주를 선별하기 위한 유전형 분석키트 및 전기 분석키트를 사용하여 반코마이신에 대한 내성을 가지는 균주를 선별하는 방법에 대해 개시되어 있지만, 본 발명의 황색포도알균에서 반코마이신 내성에 의하여 발현 차이를 보이는 유전자군에 대한 언급은 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명은 마이크로어레이 분석을 통하여 황색포도알균의 반코마이신 불균질 내성 (hVISA) 균주 중 ST5 및 ST72에서 특이적으로 발현 증감을 나타내는 유전자군을 선별하고, 이를 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA) 판별 및 클론타입 확진을 위한 판별용 바이오마커 조성물 및 판별용 키트로 사용하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 목적은 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입 및 ST72 클론타입 판별용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 또한 본 발명은 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST75와 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST75 클론타입 구별용 바이오마커 조성물을 제공하고자 한다.
- [0011] 또한 본 발명의 다른 목적은 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입 및 ST72 클론타입 판별용 키트를 제공하고자 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST75와 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST75 클론타입 구별용 키트를 제공하고자 한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입 및 ST72 클론타입 판별방법을 제공하고자 한다.

다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 마이크로어레이 분석을 통하여 황색포도알균의 반코마이신 불균질 내성(hVISA) 균주 중 ST5 및 ST72에서 특이적으로 발현 증감을 나타내는 유전자군을 선별하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균(hVISA)의 클론타입 확인을 위한 판별용 바이오마커 조성물 및 판별용 키트에 관한 것으로, 본 발명의 바이오마커 조성물 및 키트를 이용하면 상기 클론타입에 따른 발현차이를 나타내는 유전자군의 조합을 통하여 한번에 hVISA 여부 진단 및 클론타입을 결정할 수 있어 임상적으로 간편하고 유효성 있는 판별방법 및 판별용 키트 제작에 사용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8A(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A)(GenBank accession ID NP_644939.1), 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8B(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8B)(GenBank accession ID NP_644940.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1) 및 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 바이오마커 조성물을 제공할 수 있다.

[0016] 상기 바이오마커 조성물은 우레아제 약제사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 무레인 가수분해효소 조절자 LrgA(murein hydrolase regulator LrgA)(GenBank accession ID: NP_645053.1), 안티홀린 유사 단백질 LrgB(antiholin-like protein LrgB)(GenBank accession ID: NP_645054.1), 티아민 포스페이트 피로가인산분해효소 ThiE(thiamine-phosphate pyrophosphorylase ThiE)(GenBank accession ID: NP_646831.1), 하이드록시에틸티아졸 키나아제 ThiM(hydroxyethylthiazole kinase ThiM)(GenBank accession ID: NP_646832.1), 포스포메틸피리미딘 키나아제 ThiD(phosphomethylpyrimidine kinase ThiD)(GenBank accession ID: NP_646833.1), 카바메이트 키나아제(carbamate kinase; arcC)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/oirnithine antiporter; arcD)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 오르니틴 카바모일전이효소(oirnithine carbamoyltransferase; arcB)(GenBank accession ID: NP_647372.1), 아르기닌 디미나아제(arginine deiminase; arcA)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2C(oligopeptide transporter permease 2C; opp-2C)(GenBank accession ID: NP_646086.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2B(oligopeptide transporter permease 2B; opp-2B)(GenBank accession ID: NP_646087.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 A 전구체(IgG binding protein A precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), sdrE(Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645335.1) 및 포도알균 혈액응고효소 전구체(staphylocoagulase precursor)(GenBank accession ID: NP_645021.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 더 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 바이오마커 조성물일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8A(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A)(GenBank accession ID NP_644939.1), 캡슐 폴리사카라이드 생합성 단백질 Cap8B(capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8B)(GenBank accession ID NP_644940.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1) 또는 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1)에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드, 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황

색포도알균 ST72 클론타입 구별용 키트를 제공할 수 있다.

[0018] 상기 구별용 키트는 우레아제 약제사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 우레아제 약제사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 무레인 가수분해효소 조절자 LrgA(murein hydrolase regulator LrgA)(GenBank accession ID: NP_645053.1), 안티홀린 유사 단백질 LrgB(antiholin-like protein LrgB)(GenBank accession ID: NP_645054.1), 티아민 포스페이트 피로가인산분해효소 ThiE(thiamine-phosphate pyrophosphorylase ThiE)(GenBank accession ID: NP_646831.1), 하이드록시에틸티아졸 키나아제 ThiM(hydroxyethylthiazole kinase ThiM)(GenBank accession ID: NP_646832.1), 포스포메틸피리미딘 키나아제 ThiD(phosphomethylpyrimidine kinase ThiD)(GenBank accession ID: NP_646833.1), 카바메이트 키나아제(carbamate kinase; arcC)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/oornithine antiporter; arcD)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 오르니틴 카바모일전이효소(oornithine carbamoyltransferase; arcB)(GenBank accession ID: NP_647372.1), 아르기닌 디이미나아제(arginine deiminase; arcA)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2C(oligopeptide transporter permease 2C; opp-2C)(GenBank accession ID: NP_646086.1), 올리고펩타이드 운반체 투과효소 2B(oligopeptide transporter permease 2B; opp-2B)(GenBank accession ID: NP_646087.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 A 전구체(IgG binding protein A precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), sdrE(Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645335.1) 및 포도알균 혈액응고효소 전구체(staphylocoagulase precursor)(GenBank accession ID: NP_645021.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드, 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위한 프라이머를 추가로 더 포함하는 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST5 클론타입과 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균 ST72 클론타입 구별용 키트일 수 있다.

[0019] 삭제

[0020] 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 증합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0022] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0023] 상기 "항체"란 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 상기 언급한 하나 이상의 단백질 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.

[0024] 상기 "펩티드"란 완전한 항체의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위(결합 도메인)를 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 펩티드는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미한다. 상기 펩티드는 최소한 7개 이상의 아미노산, 바람직하게는 9 개 이상의 아미노산, 보다 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.

- [0025] 삭제
- [0026] 삭제
- [0027] 삭제
- [0028] 삭제
- [0029] 삭제
- [0030] 삭제

[0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0032] <실시예 1> 반코마이신(vancomycin)내성 균주

[0033] 4명의 환자로부터 분리된 메티실린 저항성 황색포도알구균(methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA)에 반코마이신을 지속적으로 사용하여 반코마이신 불균질 내성을 보이는 hVISA로 변화된 균주 쌍을 표 1과 같이 높은 hVISA 빈도를 나타낸 두 클론타입을 선별하였다.

표 1

[0034] 마이크로어레이(Microarray) 분석 대상 균주

표현형 변화 (phenotype)	쌍(pair)	동질 유전자 쌍 균주 (isogenic paired strain)	반코마이신 MIC(mg/L)	MLST(ST)
VSSA→hVISA (n=4)	pair 1	407(VSSA)	1	ST5
		437(hVISA)	2	
	pair 2	2030(VSSA)	1.5	
		2039(hVISA)	2	
	pair 3	230(VSSA)	1.5	ST72
		257(hVISA)	3	
		pair 4	1577(VSSA)	
	1599(hVISA)		3	

[0035] <실시예 2> 반코마이신 내성에 의한 발현 차이를 나타내는 유전자군

[0036] 상기 표 1과 같은 4명의 환자에게서 분리된 ST5 및 ST72의 동질 유전자 쌍 균주(isogenic paired strain)을 이용하여 마이크로어레이를 수행하여 표 2와 같이 hVISA로 변화되었을 때 VSSA 균주와 1.5배 이상 발현차이를 나타내는 유전자를 확보하였다.

표 2

[0037] hVISA 균주에서 발현차이를 나타내는 유전자군 수

	pair 1	pair 2	pair 3	pair 4
발현증가	102	372	114	246
발현감소	182	482	127	306
총계	284	854	241	552

[0038] 1. ST5 클론타입 hVISA에서 반코마이신 내성에 의한 발현 차이를 나타내는 유전자군

[0039] 상기 표 2의 유전자군에서 ST5 클론타입의 hVISA에서 공통적으로 발현이 증가한 유전자군(표 3)과 발현감소(표 4)를 나타내는 유전자군을 선별하였다.

표 3

[0040]

ORF ID	유전자	설명	동질 유전자 쌍		GenBank accession ID
			1	2	
Metabolic and cellular process					
MW0426	gltB	glutamate synthase large subunit	1.60	2.60	NP_645243.1
MW2132	alsS	acetolactate synthase	1.56	1.82	NP_646949.1
MW2537	nrdD	anaerobic ribonucleoside triphosphate	1.94	1.70	NP_647354.1
MW2553	arcC	carbamate kinase	1.55	2.01	NP_647370.2
MW2554	arcD	arginine/oirnithine antiporter	1.68	2.22	NP_647371.1
MW2555	arcB	oirnithine carbamoyltransferase	1.95	1.85	NP_647372.1
MW2556	arcA	arginine deiminase	1.61	1.55	NP_647373.1
Polysaccharide metabolism					
MW0124	cap8A	capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A	1.52	15.12	NP_644939.1
MW0125	cap8B	capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8B	1.51	15.13	NP_644940.1
Cell adhesion					
MW0518	sdrE	Ser-Asp rich fibrinogen-binding bone sialoprotein-binding protein	1.80	3.09	NP_645335.1
Cell death and pathogenesis					
MW0206	coa	staphylocoagulase precursor	1.74	7.02	NP_645021.1
Transport and localization					
MW1274	pstB	phosphate transporter ATP-binding protein	2.12	2.70	NP_646091.1

표 4

[0041]

ORF ID	유전자	설명	동질 유전자 쌍		GenBank accession ID
			1	2	
Regulation of metabolic process					
MW1813	recX	recombination regulator	-1.51	-2.45	NP_646630.1

[0042] 그 결과, ST5 클론타입의 hVISA에서는 대사 관련 유전자 및 캡슐 형성 유전자들의 발현이 증가된 반면, 발현 감소를 나타내는 유전자의 비율은 현저히 낮았다.

[0043] 2. ST72 클론타입 hVISA에서 반코마이신 내성에 의한 발현 차이를 나타내는 유전자군

[0044] 상기 표 2의 유전자군에서 ST72 클론타입의 hVISA에서 공통적으로 발현이 증가한 유전자군(표 5)과 발현감소(표 6)를 나타내는 유전자군을 선별하였다.

표 5

[0045]

ORF ID	유전자	설명	동질 유전자 쌍		GenBank accession ID
			3	4	
Metabolic and cellular process					
MW2014	thiE	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	2.01	3.66	NP_646831.1
MW2015	thiM	hydroxyethylthiazole kinase	1.91	5.31	NP_646832.1
MW2016	thiD	phosphomethylpyrimidine kinase	1.68	5.54	NP_646833.1
MW2531	betA	choline dehydrogenase	1.56	2.24	NP_647348.1
Nitrogen metabolism					
MW2206	ureA	urease gamma subunit	2.22	10.35	NP_647023.1
MW2207	ureB	urease beta subunit	2.54	9.93	NP_647024.1

MW2208	ureC	urease alpha subunit	2.01	7.71	NP_647025.1
MW2209	ureE	urease accessory protein UreE	1.81	6.59	NP_647026.1
MW2210	ureF	urease accessory protein UreF	1.85	7.33	NP_647027.1
MW2211	ureG	urease accessory protein UreG	1.41	6.98	NP_647028.1
MW2212	ureD	urease accessory protein UreD	1.64	6.73	NP_647029.1
Polysaccharide metabolism					
MW0124	cap8A	capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8A	1.51	1.86	NP_644939.1
MW0125	cap8B	capsular polysaccharide biosynthesis protein Cap8B	1.52	1.57	NP_644940.1
Cell death and pathogenesis					
MW1940	hly	beta-hemolysin, partial	1.53	2.09	NP_646757.1
Transport and localization					
MW1269	opp-2C	oligopeptide transporter permease 2C	1.97	2.01	NP_646086.1
MW1270	opp-2B	oligopeptide transporter permease 2B	1.69	1.99	NP_646087.1

표 6

[0046]

ORF ID	유전자	설명	동질 유전자 쌍		GenBank accession ID
			3	4	
Metabolic and cellular process					
MW0694	nrdF	ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	-1.50	-1.66	NP_645511.1
MW0857	clpB	hypothetical protein MW0857	-1.58	-1.56	NP_645674.1
Cell death and pathogenesis					
MW0084	spa	IgG binding protein A precursor	-22.05	-5.69	NP_644899.1
MW0238	lrgA	murein hydrolase regulator LrgA	-1.67	-4.32	NP_645053.1
MW0239	lrgB	antiholin-like protein LrgB	-1.78	-3.67	NP_645054.1
MW1378	lukF	Panton-Valentine leukocidin chain F precursor	-2.04	-2.03	NP_646195.1
Regulation of metabolic process					
MW0085	sarH1	hypothetical protein MW0085	-2.46	-2.41	NP_644900.1

[0047]

그 결과, 대사 관련 유전자와 nitrogen 대사에 관련된 urease 관련 유전자들의 발현이 증가되었고, 세포 사멸 및 병인에 관련된 유전자들의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0048]

상기 결과들로부터, VSSA 균주에서 hVISA로 변화되는데 관여하는 유전자들을 마이크로어레이(microarray) 결과분석을 통해 정리하면, 표 7과 같다.

표 7

[0049]

유전자의 기능	유전자	발현량 변화	
		ST5	ST72
Cell wall biosynthesis	cap8AB	증가	증가
Nitrogen metabolism & urease production	ureA,B,C,E,F,G,D	-	증가
Peptidoglycan turnover (murein hydrolase)	lrgA, lrgB	-	감소
VitB1 metabolism (carbohydrate metabolism 촉진)	thiE,M,D	-	증가
Arginine catabolic pathway (ammonia + CO ₂ 생성)	arcC,D,B,A	증가	-
Nitrogen nutrition/Ni transport surface protein	opp-2C, opp-2b	-	증가
	spa	-	감소
	sdrE, coa	증가	-

[0050]

상기 표 7과 같이 캡슐형성에 관여하는 유전자의 경우, 클론타입과 무관하게 유전자 발현이 증가하였으며, 다른

유전자들의 경우 클론 타입에 따라 특이적으로 발현 증감을 나타내었다.

[0051] 따라서, 상기 클론 타입에 따른 발현차이를 나타내는 유전자군의 조합을 통하여 한번에 hVISA 진단 및 클론 타입을 결정할 수 있는 임상적으로 유효성 있는 키트 제작 가능성을 확인하였다.

[0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.