



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0120639
(43) 공개일자 2013년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0043682
(22) 출원일자 2012년04월26일
심사청구일자 2012년04월26일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김양수
서울특별시 성동구 옥수동 삼성아파트 104동 901호
정진용
경기도 성남시 분당구 서현동 시범단지한양아파트 326동 1406호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **m e c A 유전자를 탑재한 카세트 염색체 유형 분석방법**

(57) 요약

본 발명은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석 방법에 관한 것으로, SCCmec 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플에서 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hib 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자를 보유하지 않는 경우 SCCmec IV 유형으로 진단할 수 있기 때문에 환자의 치료에 대한 반응과 예후를 판단할 수 있다.

(72) 발명자

정용필

서울특별시 강동구 성내1동 295 성안마을청구아파트 101동 1507호

박기호

서울특별시 양천구 신정1동 신시가지10단지아파트 1014동 801호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029936

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 예방 백신, 진단법, 치료법, 예후 판정법 개발을 위한 MRSA와 수퍼박테리아의 타겟 발굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029937

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 MRSA와 수퍼박테리아의 임상 연구, 균주와 인체자원 확보 및 분자세균학적 연구를 통한 타

겟 발굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029938

부처명 교육과학기술부

연구사업명 의학-첨단과학기술개발

연구과제명 Transcriptome 및 proteome 기술을 이용하여 수퍼박테리아 제어를 위한 세균학적 타겟 발

굴

주관기관 울산대학교산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 보유 여부를 지표로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 분석방법은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플 중 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자의 보유 여부를 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 유전자의 보유 여부는 멀티플렉스 PCR 방법을 통해 분석하는 것을 특징으로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 유전자의 보유 여부는 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플 중 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자를 보유하지 않은 경우 SCCmec 유형 IV로 분석하는 것을 특징으로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서, 상기 유전자의 보유 여부는 map/eap 유전자인 경우 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍, sec 유전자인 경우 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍, tst 유전자인 경우 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍, hlb 유전자인 경우 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍 및 sel 유전자인 경우 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR 방법을 통해 분석하는 것을 특징으로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석 방법, 특히 SCCmec 유형 IV를 유형 II와 감별 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 메티실린 내성 황색포도알균(MRSA)은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec)에 의하여 유형을 결정하며, 이러한 유형으로는 I, II, III 및 IV형이 존재한다.

[0003] 이러한 유형 중에서 특히 SCCmec 유형 II와 유형 IV가 가장 흔하다. 2000년대 중반 이전에는 유형 II가 흔하였지만 이후에는 유형 IV가 증가하는 추세인데, 이러한 두가지 유형의 역학적, 임상적 특징에 차이가 있기 때문에 두가지 유형을 감별 진단하는 것은 매우 중요하다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제0060011호에서 MRSA의 간이검사용 시험지를 개시하고, 한국공개특허 제2010-0115480호에서 티타늄이소프로폭사이드 용액과의 상호작용에 의한 표면 플라즈몬 공명을 이용한 황색포도상구균 또는 표피포도상구균의 검출방법을 개시하고 있을지라도, 이러한 특허들은 SCCmec 유형을 분석하는 방법을 전혀 개시하지

못하였다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 황색포도알균에 존재하는 41개의 병원 인자의 보유율을 멀티플렉스 PCR 방법을 이용하여 분석함으로써 유형 II와 유형 IV 간에서 발현 양상의 차이를 나타내는 유전자들을 밝혀내어 SCCmec 유형을 효과적으로 감별 진단함으로써 본 발명을 완성한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 유전자의 보유여부를 지표로 하는, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형 분석방법을 제공한다.

[0008] 보다 상세하게는, 본 발명은 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플 중 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자의 보유 여부를 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0009] 상기 유전자의 보유 여부는 멀티플렉스 PCR 방법을 통해 분석할 수 있다.

[0010] 상기 유전자의 보유 여부는 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플 중 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자를 보유하지 않은 경우 SCCmec 유형 IV로 분석할 수 있다.

[0011] 상기 유전자의 보유 여부는 map/eap 유전자인 경우 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍, sec 유전자인 경우 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍, tst 유전자인 경우 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍, hlb 유전자인 경우 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍 및 sel 유전자인 경우 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR 방법을 통해 분석하는 것이 바람직하다.

[0012] 상기 환자로부터 얻은 샘플은 혈액, 뇌척수액, 관절액, 복수 등의 체액을 배양해서 얻은 황색포도알균을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따르면, SCCmec 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 샘플 즉, 황색포도알균에서 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 또는 sel 유전자의 보유 여부에 따라 SCCmec 유형을 감별 진단할 수 있기 때문에 환자의 치료에 대한 반응과 예후를 판단할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] MRSA는 mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec)에 의하여 유형을 결정하며, 특히 SCCmec 유형 II와 유형 IV는 역학적, 임상적 특징에 차이가 있기 때문에 두가지 유형을 감별 진단하는 것은 환자의 치료에 대한 반응과 예후를 판단하는 데에 매우 중요하다.

[0016] 이에, 본 발명에서는 환자로부터 얻은 황색포도알균 샘플 중에서 황색포도알균에 존재하는 41개의 병원 인자의 보유율을 종래 알려진 문헌(Infect Immun 2002, 70: 631-41; Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 2155-61; Infect Immun 2002, 70: 4987-96; J Infect Dis 2006, 193: 1495-503)에 따라 멀티플렉스 PCR 방법을 이용하여 분석함으로써 SCCmec 유형 II와 유형 IV를 감별 진단하였다.

[0017] 이러한 감별 진단에 따르면, MRSA가 환자의 조직에 부착하는데 관련된 병원 요인인 부착 요인(adhesion)의 경우

map/eap 유전자의 보유율이 SCCmec 유형 IV에서 현저하게 감소되어 있는 것을 알 수 있으며, MRSA의 독소 중에서 황색포도알균 내독소(staphylococcal enterotoxin; SE)이라는 것이 있는데, 아형 중에 sec의 보유율이 SCCmec 유형 IV에서 크게 감소되어 있는 것을 발견할 수 있었다. 또한, 황색포도알균 외독소인 tst(Toxic shock syndrome toxin)의 경우에도 SCCmec 유형 IV의 경우 보유율이 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 그리고, 그밖의 적혈구 용혈 관련 독소인 hlb, SE의 아형인 sel의 보유율이 SCCmec 유형 IV에서 유의하게 감소되어 있음을 알 수 있었다.

[0018] 따라서, map/eap, sec, tst, hlb 또는 sel의 보유 여부를 분석함으로써 MRSA SCCmec 유형을 감별 진단할 수 있으며, SCCmec 유형을 감별 진단함으로써 환자의 치료에 대한 반응과 예후를 판단할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용하는 샘플은 혈액, 뇌척수액, 관절액, 복수 등의 체액을 배양해서 얻은 황색포도알균이다. 또한, 본 발명에서 map/eap, sec, tst, hlb 또는 sel의 보유율은 멀티플렉스 PCR 방법을 통해 분석할 수 있다.

[0020] 특히, mecA 유전자를 탑재한 카세트 염색체(Staphylococcal cassette chromosomal mec; SCCmec) 유형을 분석하고자 하는 환자로부터 얻은 황색포도알균에서 map/eap 유전자, sec 유전자, tst 유전자, hlb 유전자 및 sel 유전자로 이루어진 군에서 선택된 3개 이상의 유전자를 보유하고 있지 않은 경우 SCCmec 유형 IV로서 판정하는 것이 바람직하다.

[0021] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하도록 한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0022] <실시예 1>

[0023] 먼저, 메티실린 내성 황색포도알균에 감염된 환자로부터 감염부위에서 적절한 샘플을 얻어 황색포도알균을 배양하여 균주를 얻었다.

[0024] 상기 샘플에서 황색포도알균에 존재하는 41개의 병원 인자의 보유율을 종래 알려진 문헌(Infect Immun 2002, 70: 631-41; Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 2155-61; Infect Immun 2002, 70: 4987-96; J Infect Dis 2006, 193: 1495-503)에 제시된 각 병원 인자 유전자의 PCR 프라이머(표 1 참조)를 사용하여 멀티플렉스 PCR 방법을 이용하여 분석함으로써 SCCmec 유형 II와 유형 IV를 감별 진단하였다. SCCmec 유형은 mec 유전자 부위의 염기서열을 시퀀싱하여 확인하였다.

표 1

유전자 종류	정방향 프라이머	역방향 프라이머
map/eap	5'-TAACATTTAATAAGAATCAA-3' (서열1)	5'-CCATTACTGCAATTGT-3' (서열2)
sec	5'-CCCTACGCCAGATGAGTTGCACA-3' (서열3)	5'-CGCCTGGTGCAGGCATCATATC-3' (서열4)
tst	5'-AGCCCTGCTTTTACAAAAGGGGAAAA-3' (서열5)	5'-CCAATAACCACCGTTTATCGCTTG-3' (서열6)
hlb	5'-TTGGCTGGGGAGTTGAAGCACA-3' (서열7)	5'-CGCCTGCCAGTAGAAGCCATT-3' (서열8)
sel	5'-ATCAATGGCAAGCATCAAACAG-3' (서열9)	5'-TGGAAGACCGTATCCTGTG-3' (서열10)

[0026] 그 결과, 하기 표 2와 같이 MRSA가 환자의 조직에 부착하는데 관련된 병원 요인인 부착 요인(adhesion)의 경우 map/eap 유전자의 보유율이 SCCmec 유형 II가 96%, SCCmec 유형 IV가 3%로 나타나 SCCmec 유형 IV에서 현저하게 감소되어 있는 것을 알 수 있으며, MRSA의 독소 중에서 황색포도알균 내독소 아형 중 sec의 보유율이 SCCmec 유형 II가 89.3%, SCCmec 유형 IV가 6.1%로 나타나 SCCmec 유형 IV에서 크게 감소되어 있는 것을 발견할 수 있었다.

[0027] 또한, 황색포도알균 외독소인 tst(Toxic shock syndrome toxin)의 경우에도 SCCmec 유형 II가 93.6%, SCCmec 유형 IV가 4.1%로 나타나 SCCmec 유형 IV의 경우 보유율이 현저하게 감소되어 있음을 알 수 있었다. 그리고, 그밖의 적혈구 용혈 관련 독소인 hlb의 보유율이 SCCmec 유형 II가 72.5%, SCCmec 유형 IV가 31%로 나타났으며,

SE의 아형인 sel의 보유율이 SCCmec 유형 II가 96.4%, SCCmec 유형 IV가 22.6%로 나타나 각각 SCCmec 유형 IV에서 유의하게 감소되어 있음을 알 수 있었다.

표 2

		SCCmec type II (n=282) n(%)	SCCmec type IV (n=97) n(%)
Adhesions	bbp	277(98.2)	93(95.8)
	clfA	282(100)	97(100)
	clfB	282(100)	97(100)
	c.n.a	0(0)	0(0)
	ebps	278(98.5)	93(95.8)
	fnbA	282(100)	97(100)
	fnbB	278(98.5)	95(97.9)
	map/eap	271(96)	3(3)
	sdrC	271(96)	45(46.3)
	sdrD	269(95.3)	91(93.8)
	sdrE	277(98.2)	90(92.7)
Toxin	edin	0(0)	0(0)
	eta	0(0)	0(0)
	etb	0(0)	0(0)
	hla	274(97.1)	96(98.9)
	hlb	216(72.5)	31(31)
	hld	262(92.9)	92(94.8)
	hlg	0(0)	0(0)
	hlg-2	274(97.1)	95(97.9)
	lukE	278(98.5)	94(96.9)
	lukM	0(0)	0(0)
	lukDE	280(99.2)	95(97.9)
	pvl	0(0)	0(0)
	sea	6(2.1)	2(2)
	seb	0(0)	0(0)
	sec	252(89.3)	6(6.1)
	sed	0(0)	0(0)
	see	0(0)	0(0)
	seg	278(98.5)	93(95.8)
	seh	0(0)	0(0)
	sei	275(97.5)	91(93.8)
	sej	0(0)	0(0)
	sek	4(1.4)	3(3)
	sel	272(96.4)	22(22.6)
	sem	274(97.1)	94(96.9)
	sen	276(97.8)	94(96.9)
	seo	270(95.7)	93(95.8)
	sep	17(6)	0(0)
	seq	2(0.7)	0(0)
	tst	264(93.6)	4(4.1)
	ica	282(100)	97(100)

[0028]

[0029] 따라서, map/eap, sec, tst, hlb 또는 sel의 보유 여부를 분석함으로써 MRSA SCCmec 유형을 감별 진단할 수 있으며, SCCmec 유형을 감별 진단할 수 있었다.

[0030] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

서열 목록

<110>	University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation	
<120>	Method of analysing type of Staphylococcal cassette chromosomal mec	
<130>	DP-2012-0314	
<160>	10	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for map/eap	
<400>	1	
	taacatttaa taagaatcaa	20
<210>	2	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for map/eap	
<400>	2	
	ccatttactg caattgt	17
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer for sec	
<400>	3	
	ccctacgcca gatgagttgc aca	23
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer for sec	
<400>	4	

cgctgtgtgc aggcatacata tc 22

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for tst

<400> 5

agccctgctt ttacaaaagg ggaaaa 26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for tst

<400> 6

ccaataacca ccggttttat cgcttg 26

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for hlb

<400> 7

ttggctgggg agttgaagca ca 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for hlb

<400> 8

cgctgcca gtagaagcca tt 22

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for sel

<400> 9

atcaatggca agcatcaaac ag

22

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for sel

<400> 10

tggaagaccg tadcctgtg

19