

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2015-0034306 (43) 공개일자 2015년04월03일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93	
(21) 출원번호 10-2013-0114176	(72) 발명자 김양수	
(22) 출원일자 2013년09월26일	서울 성동구 독서당로 218, 104동 901호 (옥수동, 옥수삼성아파트)	
심사청구일자 2013년09월26일	정진용	
	경기 성남시 분당구 중앙공원로 54, 225동 1402호 (서현동, 우성아파트)	
	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인태백	

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 황색포도알균의 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단 키트

(57) 요약

본 발명은 황색포도알균의 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단 키트에 관한 것으로, 상세하게는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)에서 반코마이신(vancomycin) 내성 유발에 의하여 유전자 발현에 차이를 보이는 유전자군을 확보하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단 키트에 관한 것이다. 또한 본 발명은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법을 제공한다.

(72) 발명자

정용필

서울 강동구 풍성로 114-1, 101동 1507호 (성내동, 성안마을청구아파트)

김은실

서울 강남구 개포로22길 45-15, 101호 (개포동, 미라빌라)

박수진

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120964

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 반코마이신 불균질 내성 황색포도알균의 특성

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 약세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노젠-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디아미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시에시드 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1), GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알카라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포도상구균 약세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세토락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank

accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 약세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디아미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시에시드 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1), GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알카라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포도상구균 약세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세토락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank

accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 상기 유전자를 증폭하기 위한 프라이머, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드를 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단 키트.

청구항 4

검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 악세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디아미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시시드 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1), GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알카라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포도상구균 악세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세톨락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성

(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계에서, 검체의 델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 약세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디이미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시에서 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1) 및 GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군보다 하향 발현 조절되면 반코마이신 내성 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)으로 판단하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계에서, 검체의 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알카라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포도상구균 약세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬

(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세톨락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군보다 상향 발현 조절되면 반코마이신 내성 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)으로 판단하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)에서 반코마이신(vancomycin) 내성 유발에 의하여 유전자 발현에 차이를 보이는 유전자군을 확보하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

1940년도에 페니실린이 처음 임상에 도입된 당시에는 대부분의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 페니실린 감수성이 있었으나, 1941년도부터 출현한 페니실린 내성은 급속히 증가하여 1950년대에는 이미 60% 이상의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)이 페니실린 내성을 보유하였다. 이를 치료하기 위하여 개발된 메티실린(methicillin)이 1960년도에 도입되었으나 1961년도부터 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *S. aureus*; MRSA)이 출현하기 시작했다. 1970-80년대에 범세계적으로 MRSA에 의한 병원 감염이 확산되어 반코마이신(vancomycin)이 임상에서 광범위하게 사용되었다. 한편, 1996년도에는 일본에서 반코마이신 중간내성 황색

포도알균(vancomycin-intermediate *S. aureus*; VISA)이 처음 발견되었으며, 2002년도에는 미국에서 반코마이신 고도내성 황색포도알균(Vancomycin-resistant *S. aureus*; VRSA)이 최초로 보고되었다. 황색포도알균(*S. aureus*)에 대한 반코마이신의 MIC 해석기준은 다음과 같다. 반코마이신에 대한 MIC가 2 mg/L 이하인 황색포도알균(*S. aureus*)은 감수성 균주(vancomycin-sensitive *S. aureus*; VSSA)이고, 4-8 mg/L은 중간내성 균주(VISA)이며, 16 mg/L 이상은 고도 내성 균주(VRSA)이다.

[0003] 현재 반코마이신 내성 균주를 검출하기 위해서는 바우어-커비 테스트(Bauer-Kirby test), MIC(minimal inhibitory concentration) 또는 PCR법 등이 이용되고 있는데, 디스크 검사법이라고도 불리는 바우어-커비 테스트는 물리히톤(Muller Hinton) 한천 배지 위에 세균이 있는 배양액을 접종한 후, 항생제가 들어 있는 디스크를 놓아 그 주위에 생기는 억제환의 크기로 항생제에 대한 세균의 민감성을 측정하는 방법이다. MIC는 항생제가 연속적으로 희석된 유리관에 일정한 양의 세균을 넣고 성장 여부를 결정하여, 세균의 성장을 억제하기 위해 필요한 최소한의 항생제 농도를 측정하는 것이다. PCR은 내성 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 사용하여 효소중합반응이 일어나는지의 여부로 내성 유전자의 존재 여부를 결정한다. 그러나, 종래의 반코마이신에 대한 내성균 탐지 방법들은 시간이 많이 걸릴 뿐만 아니라, 사용 방법이 복잡하여 한번에 다량의 시료를 신속하게 검사하는 데 큰 어려움이 있었다.

[0004] 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 관해 개시되어 있지만, 본 발명의 황색포도알균에서 반코마이신 내성에 의하여 발현 차이를 보이는 유전자군에 대한 언급은 없다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 마이크로어레이(microarray) 분석을 통하여 황색포도알균에서 반코마이신(vancomycin) 내성에 의하여 유발되는 유전자군을 확보하고, 이들을 이용하여 반코마이신(vancomycin) 내성균을 제어할 수 있는 새로운 세균학적 타겟 유전자들을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단 키트를 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 약세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디이미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시에시드 디

하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1), GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemplysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알카라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포두상구균 악세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세토락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 캡슐 다당체 생합성(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 캡슐 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기에서 언급한 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브, 상기 유전자를 증폭하기 위한 프라이머, 상기 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 상기 단백질에 특이적인 결합 도메인을 갖는 펩티드를 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 진단 키트를 제공한다. 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트이지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0011] 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 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4 가지의 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0012] 상기 "프로브"는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 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.

[0013] 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.

[0014] 상기 "펩티드"란 온전한 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.

[0015] 또한, 본 발명은 검체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 악세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디이미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/orinithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시시드 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1), GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1), 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알칼라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank accession ID: NP_647024.1), 포도상구균 악세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말

레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세토락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성 (capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법을 제공한다.

[0016]

상세하게는, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계에서, 검체의 델타-헤모라이신(delta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646776.1), 면역글로불린 G 결합 단백질 전구체(immunoglobulin G binding protein precursor; SPA)(GenBank accession ID: NP_644899.1), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor)(GenBank accession ID: NP_646706.1), 지단백질(lipoprotein)(GenBank accession ID: NP_644901.1), IgG-결합 단백질 SBI(IgG-binding protein SBI)(GenBank accession ID: NP_647158.1), 클럼핑 인자 B(Clumping factor B)(GenBank accession ID: NP_647368.1), AgrC(GenBank accession ID: NP_646779.1), 악세사리 유전자 조절자 A(accessory gene regulator A)(GenBank accession ID: NP_646780.1), 알라닌 디하이드로게나제(alanine dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_646469.1), 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(ornithine carbamoyltransferase)(GenBank accession ID: NP_645867.1), 알파-헤모라이신 전구체(Alpha-hemolysin precursor)(GenBank accession ID: NP_645861.1), 트레오닌 디하이드라타제(threonine dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646802.1), 피브리노겐-결합 단백질(fibrinogen-binding protein)(GenBank accession ID: NP_645581.1), 카바메이트 키나제(carbamate kinase)(GenBank accession ID: NP_647370.2), 아르기닌 디이미나제(arginine deiminase)(GenBank accession ID: NP_647373.1), 아르기닌/오르니틴 안티포터(arginine/ornithine antiporter)(GenBank accession ID: NP_647371.1), 2-하이드록시에시드 디하이드로게나제(2-hydroxyacid dehydrogenase)(GenBank accession ID: NP_647261.1), GroES 단백질(GroES protein)(GenBank accession ID: NP_646771.1), 열-유도 전사 리프레서(Heat-inducible transcriptional repressor)(GenBank accession ID: NP_646351.1) 및 GrpE 단백질(GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20))(GenBank accession ID: NP_646350.1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군보다 하향 발현 조절되면 반코마이신 내성 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)으로 판단하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법을 제공한다.

[0017]

상세하게는, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 대조군과 비교하는 단계에서, 검체의 티오레독신 리덕타제(thioredoxin reductase)(GenBank accession ID: NP_645543.1), 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)(GenBank accession ID: NP_646091.1), 절단된 베타-헤모라이신(truncated beta-hemolysin)(GenBank accession ID: NP_646757.1), 알칼라인 포스파타제 III 전구체(alkaline phosphatase III precursor)(GenBank accession ID: NP_647364.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreE(urease accessory protein UreE)(GenBank accession ID: NP_647026.1), 우레아제 감마 서브유닛(urease gamma subunit)(GenBank accession ID: NP_647023.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreD(urease accessory protein UreD)(GenBank accession ID: NP_647029.1), 우레아제 악세사리 단백질 UreF(urease accessory protein UreF)(GenBank accession ID: NP_647027.1), 우레아제 알파 서브유닛(urease alpha subunit)(GenBank accession ID: NP_647025.1), 우레아제 베타 서브유닛(urease beta subunit)(GenBank

accession ID: NP_647024.1), 포두상구균 약세사리 조절자 A(staphylococcal accessory regulator A)(GenBank accession ID: NP_645397.1), 우레아제 약세사리 단백질 UreG(urease accessory protein UreG)(GenBank accession ID: NP_647028.1), 호흡 질산염 환원효소 알파 사슬(respiratory nitrate reductase alpha chain)(GenBank accession ID: NP_647136.1), 질산염 환원효소 베타 사슬 narH(nitrate reductase beta chain narH)(GenBank accession ID: NP_647135.1), PTS 시스템 락토스-특이 IIBC 구성성분(PTS system lactose-specific IIBC component)(GenBank accession ID: NP_646933.1), 엔테로톡신 타입 C 전구체(enterotoxin type C precursor)(GenBank accession ID: NP_645576.1), 2-이소프로필말레이트 합성효소(2-isopropylmalate synthase)(GenBank accession ID: NP_646798.1), 케톨-산 리덕토이소머라제(ketol-acid reductoisomerase)(GenBank accession ID: NP_646797.1), 3-이소프로필말레이트 디하이드라타제 스몰 서브유닛(3-isopropylmalate dehydratase small subunit)(GenBank accession ID: NP_646799.1), 티아민 포스페이트 합성효소(thiamin phosphate synthase (chain B))(GenBank accession ID: NP_646831.1), 2-성분 반응 조절자(two-component response regulator)(GenBank accession ID: NP_646641.1), 아세톨락테이트 합성효소 라지 서브유닛(acetolactate synthase large subunit)(GenBank accession ID: NP_646795.1), 디하이드록시-산 디하이드라타제(dihydroxy-acid dehydratase)(GenBank accession ID: NP_646794.1), 협막 다당체 생합성(capsular polysaccharide biosynthesis)(GenBank accession ID: NP_647401.1), 협막 다당체 생합성 효소 Cap8C(capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C)(GenBank accession ID: NP_644941.1), 프로톤/소듐-글루타메이트 심포트 단백질(proton/sodium-glutamate symport protein)(GenBank accession ID: NP_647121.1), Cap8M(GenBank accession ID: NP_644951.1), Cap8D(GenBank accession ID: NP_644942.1), Cap8E(GenBank accession ID: NP_644943.1), Cap8B(GenBank accession ID: NP_644940.1), Cap8L(GenBank accession ID: NP_644950.1), Cap8N(GenBank accession ID: NP_644952.1), 2-성분 센서 히스티딘 키나제(two-component sensor histidine kinase)(GenBank accession ID: NP_646642.1) 및 Cap8P(GenBank accession ID: NP_644954.1)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 대조군보다 상향 발현 조절되면 반코마이신 내성 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)으로 판단하는 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성을 판별하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 용어, "대조군" 은 반코마이신에 대해 감수성인 황색포도알균(*S. aureus*)으로부터 분리된 유전자의 mRNA 또는 단백질을 의미한다.

[0019] 상세하게는, 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법 (RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅 (Northern blotting) 및 DNA 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0020] 상세하게는, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩을 이용하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명에서 용어, "진단" 은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 반코마이신 내성 여부를 확인하는 것이다.

[0022] 본 발명에서 용어, "진단 마커, 진단용 마커 또는 진단용 바이오 마커" 란 반코마이신 내성 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)를 정상세포(감수성 세포)와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포(감수성 세포)에 비하여 내성 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산 (예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당 (단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)에서 반코마이신(vancomycin) 내성 유발에 의하여 유전자 발현

에 차이를 보이는 유전자군을 확보하고, 이렇게 확보된 유전자군을 포함하는 반코마이신 내성 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단 키트에 관한 것으로서, 본 발명을 이용하면 반코마이신(vancomycin) 내성에 대한 배양검사 이외의 새로운 진단 기술을 개발하고 치료에 활용함으로써 반코마이신(vancomycin) 내성의 원내 획득 감염 및 지역사회 획득 감염을 차단하는데 도움이 될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 반코마이신(vancomycin) 내성 균주

반코마이신(vancomycin)에 감수성인 황색포도알균 균주(*Staphylococcus aureus* YSK2094)와 중도 내성인 황색포도알균 균주(*Staphylococcus aureus* AMC11094)를 지속적으로 반코마이신(vancomycin)에 노출함으로써 반코마이신(vancomycin)에 고도 내성을 보이는 돌연변이 균주를 확보하였다(표 1).

표 1

균주	반코마이신(Vancomycin)	표현형 (Phenotype)	<i>agr</i>
	MIC(mg/L)		function
YSK2094	2	VSSA	function
YSK2	4	-	function
YSK6	6	-	function
YSK10	8	-	function
YSK-VRSA	32	VRSA	dysfunction
AMC11094	4	VISA	dysfunction
AMC12	10	-	dysfunction
AMC16	12	-	dysfunction
AMC32	16	-	dysfunction
AMC-VRSA	32	VRSA	dysfunction

<실시예 2> 반코마이신(vancomycin) 내성에 의하여 발현의 차이를 보이는 유전자군

상기 표 1의 균주들을 대상으로 마이크로어레이(microarray)를 수행하여 발현에 변화를 보이는 균주들을 확보하였다(표 2).

표 2

분석대상	YSK2094				AMC11094			
Positive fold	YSK2	YSK6	YSK10	YSK-VRSA	AMC12	AMC16	AMC32	AMC-VRSA
2<=FC<5	39	79	139	173	57	57	22	136
5<=FC<10	0	6	1	19	1	1	2	7
10<=FC<15	0	1	0	5	0	0	0	1
15<=FC<20	0	0	0	2	0	0	0	1
FC>=20	0	0	0	10	0	0	0	6
증가	39	86	140	209	58	58	24	151
Negative fold	YSK2	YSK6	YSK10	YSK-VRSA	AMC12	AMC16	AMC32	AMC-VRSA
'-5<=FC<-2	30	44	104	167	68	69	20	117
'-10<=FC<-5	3	3	10	26	7	0	0	17
'-15<=FC<-10	0	0	0	5	1	0	0	2

'-20<=FC<-15	0	0	0	6	0	0	0	1
'FC<-20	0	1	0	12	1	0	0	5
합소	33	48	114	216	77	69	20	142

[0031]

상기 표 2의 유전자군에서 YSK2094와 AMC11094 균주들에서 공통으로 발현이 감소(표 3) 하거나 증가(표 4)하는 유전자군을 확보하였다.

표 3

[0032]

YSK2094와 AMC11094 균주들에서 공통적으로 발현이 감소하는 유전자군

Fc	Description	GenBank accession ID
-90.53	delta-hemolysin	NP_646776.1
-65.53	immunoglobulin G binding protein precursor (SPA)	NP_644899.1
-43.53	staphylococcal enterotoxin A precursor	NP_646706.1
-11.71	lipoprotein	NP_644901.1
-8.69	IgG-binding protein SBI	NP_647158.1
-8.02	Clumping factor B	NP_647368.1
-6.85	AgrC	NP_646779.1
-5.90	accessory gene regulator A	NP_646780.1
-4.94	alanine dehydrogenase	NP_646469.1
-4.53	ornithine carbamoyltransferase	NP_645867.1
-3.93	Alpha-hemolysin precursor	NP_645861.1
-3.89	threonine dehydratase	NP_646802.1
-3.24	fibrinogen-binding protein	NP_645581.1
-3.18	carbamate kinase	NP_647370.2
-3.13	arginine deiminase	NP_647373.1
-2.64	arginine/ornithine antiporter	NP_647371.1
-2.32	2-hydroxyacid dehydrogenase	NP_647261.1
-1.41	GroES protein	NP_646771.1
-1.26	Heat-inducible transcriptional repressor	NP_646351.1
-1.25	GrpE protein (HSP-70 Cofactor HSP20)	NP_646350.1

표 4

[0033]

YSK2094와 AMC11094 균주들에서 공통적으로 발현이 증가하는 유전자군

Fc	Description	GenBank accession ID
181.63	thioredoxin reductase	NP_645543.1
35.56	phosphate ABC transporter ATP-binding protein	NP_646091.1
14.22	truncated beta-hemolysin	NP_646757.1
14.05	alkaline phosphatase III precursor	NP_647364.1
6.31	urease accessory protein UreE	NP_647026.1
6.13	urease gamma subunit	NP_647023.1
5.97	urease accessory protein UreD	NP_647029.1
5.87	urease accessory protein UreF	NP_647027.1
5.73	urease alpha subunit	NP_647025.1
5.55	urease beta subunit	NP_647024.1
4.61	staphylococcal accessory regulator A	NP_645397.1
4.18	urease accessory protein UreG	NP_647028.1
4.09	respiratory nitrate reductase alpha chain	NP_647136.1

3.53	nitrate reductase beta chain narH	NP_647135.1
3.35	PTS system lactose-specific IIBC component	NP_646933.1
3.33	enterotoxin type C precursor	NP_645576.1
3.19	2-isopropylmalate synthase	NP_646798.1
2.88	ketol-acid reductoisomerase	NP_646797.1
2.78	3-isopropylmalate dehydratase small subunit	NP_646799.1
2.49	thiamin phosphate synthase (chain B)	NP_646831.1
2.47	two-component response regulator	NP_646641.1
2.47	acetolactate synthase large subunit	NP_646795.1
2.23	dihydroxy-acid dehydratase	NP_646794.1
2.23	capsular polysaccharide biosynthesis	NP_647401.1
2.09	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8C	NP_644941.1
2.09	proton/sodium-glutamate symport protein	NP_647121.1
2.05	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8M	NP_644951.1
2.01	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8D	NP_644942.1
1.76	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8E	NP_644943.1
1.75	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8B	NP_644940.1
1.65	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8L	NP_644950.1
1.56	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8N	NP_644952.1
1.33	two-component sensor histidine kinase	NP_646642.1
1.13	capsular polysaccharide synthesis enzyme Cap8P	NP_644954.1

[0034]

그 결과, 독소(toxin)과 관련하여, 적혈구를 파괴하는 델타-헤모라이신(delta-hemolysin), 세포벽에 있는 물질로 IgG의 Fc부분에 결합하여 보체와 상호작용을 방해하는 면역글로불린 G 결합(immunoglobulin G binding), 단백질 전구체(protein precursor), 포도상구균 엔테로톡신 A 전구체(staphylococcal enterotoxin A precursor) 등의 독소들이 마이크로어레이(microarray) 결과, 수퍼박테리아에서 40배 이상 발현이 감소함을 보여주었다(표 3). 상기와 같은 다양한 독소들을 대상으로 라이브러리를 제작하여 임상적으로 유효성이 있는 키트(kit)의 제작 가능성을 확인하였다.

[0035]

또한, 세포벽(cell wall)과 표면 단백질(surface protein)과 관련하여, 세포벽에 존재하는 수용체인 포스페이트 ABC 수송 ATP-결합 단백질(phosphate ABC transporter ATP-binding protein)을 비롯한 다양한 세포벽 형성 인자 및 표면 단백질이 의미있는 증감을 보여주었다(표 3). 상기와 같은 다양한 세포벽 구성요소 및 수용체들을 대상으로 라이브러리를 제작하여 임상적으로 유효성이 있는 키트(kit)의 제작 가능성을 확인하였다.

[0036]

한편, 7종의 우레아제(urease) 관련 유전자 (urease accessory protein UreE, urease gamma subunit, urease accessory protein UreD, urease accessory protein UreF, urease alpha subunit, urease beta subunit, urease accessory protein UreG)와 관련하여, 반코마이신(vancomycin) 내성 균주에서 거의 모든 우레아제(urease) 관련 유전자가 의미있게 증가하였으므로, 이들 유전자의 증감으로 임상적 유효성을 검증할 수 있다(표 4).