

Staphylococcus aureus 에서 분리된 plasmid 상의 항생물질 저항성 인자에 관한 연구 : Chloramphenicol 저항성 인자의 클로닝

권동현 · 김영선 · 변우현

강원대학교 자연과학대학 생물학과

Studies on antibiotics resistance gene in *Staphylococcus aureus* Plasmid: Cloning of chloramphenicol resistance determinant

Kwon Dong Hyeon, Young-Sun Kim, Woo-Hyeon Byeon

Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Kang Weon National University

Abstract: R-plasmid(pSBK203, 2.5Mdal) conferring chloramphenicol resistance was isolated from multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* D-H-1, *Bacillus subtilis* BD170 was transformed by this plasmid and restriction enzyme cleavage sites of this plasmid were mapped for the cloning of chloramphenicol resistance gene.

Taq I partial digested fragment of pSBK203 (1.3kb) inserted into *Cla* I site of pBD9 appears to have both regulatory region for induction and structural gene for chloramphenicol resistance whereas *Rsa* I fragment (1.3 kb, both ends are staggered away 0.1Kb from those of *Taq* I fragment) inserted into *Sca* I site of pBR322 showed constitutive expression in *E. coli*.

Hinf I, *Taq* I, and *Bgl* II restriction enzyme recognition sites are found in both, *Rsa* I fragment and *Taq* I fragment. Among these, *Bgl* II recognition site was associated with chloramphenicol resistance.

Key words: Chloramphenicol resistance *Staphylococcus aureus*

항생물질에 대하여 저항성을 갖는 R-plasmid 가 처음 확인된 것은 1957년 항생물질을 사용한 환자 체내에서 분리된 *Shigella dysenteriae* 에서였다(Meynell, 1972). 그 이후 1963년 T. Watanabe 에 의하여 R-plasmid 에 관한 일반적 특성이 발표(Watanabe, 1967)되면서 활발한 연구가 이루어져 왔는데 그람 음성균은 주로 *Shigella* 속(Luria 등, 1960), *Salmonella* 속(Watanabe 등, 1970) 및 *E. coli*(Watanabe and Ogata, 1966) 등에서 연구가 진행되어 왔으며 그람 양성균의 경우는 *Staphylococcus* 속(Novick, 1963; Novick and Brodsky, 1972;

Wilson and Baldwin, 1978; Wilson 등, 1981; Iordanescu, 1977), *Streptococcus* 속(LeBlanc and Lee, 1979; Macrina 등, 1980; Clewell, 1981) 및 *Bacillus* 속(Lovett 등, 1982; Gryczan 등, 1980; Gryczan and Dubnau, 1978; Gryczan 등, 1980)을 대상으로 한 연구가 진행되어 왔다. 특히 그람 양성균에서 분리된 R-plasmid 들에 대해서는 숙주들간의 형질 전환 및 전환된 세균내에서의 유전자 발현에 관한 시도가 Ehrlich(Ehrlich, 1977)에 의해 수행되었으며 Gryczan 등에 의해서는 cloning vehicle 의 개발로까지 진전되기에 이르렀다(Gryczan 등,

본 연구는 1985년도 문교부 기초 과학육성연구비의 지원에 의한 것임

1980).

R-plasmid가 갖는 여러 항생물질에 대한 저항성중 chloramphenicol(Cm) 저항성은 일반적으로 그람 음성균 내에서는 지속성인데 비해 그람 양성균 내에서는 유발성인 경우만 발견되었는데 (Fitton and Shaw, 1979) 돌연변이에 의한 rRNA의 염기서열 변화나 리보솜 단백질의 변화에 의한 경우도 보고된 바 있지만(Charles and Timothy, 1985; Linda 등, 1984) 대부분 chloramphenicol acetyltransferase(CAT) 유전자 산물에 의하여 저항성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그람 양성균에서 CAT를 합성하는 유전자에 관한 연구는 주로 Shaw 등에 의하여 수행되었는데(Shaw and Brodsky, 1968; Shaw 등, 1979) 유전적 분석이 이루어진 경우는 *Staphylococcus aureus* 내에서 분리된 pC194(Horinouchi and Weisblum, 1982)와 pC221상의 CAT 유전자 또 *Bacillus pumilus* 염색체 상에서 클로닝 된 *cat-86* 유전자(Duvall 등, 1983; Duvall 등, 1985, Niclolas 등, 1985) 등이 있다. 이들 CAT 유전자는 모두 구조적·기능적으로 유사한 유전자 산물을 합성하는 것으로 알려져 있으며(Harwood 등, 1983) 특히 pC194의 CAT 유전자와 *cat-86* 유전자의 발현 유발은 해독단계 조절을 받는 것으로 밝혀져 있다(Duvall 등, 1983; Byeon and Weisblum, 1984).

본 연구는 *Staphylococcus aureus* 에서 분리된 plasmid(pSBK203) 상의 유발성 Cm 저항성 유전자를 대상으로 하여 궁극적으로는 유발성 Cm 저항성 유전자의 유발기작을 밝히기 위한 목적으로 일단 *Bacillus subtilis* 를 형질전환 시킨 뒤 형질전환된 *B. subtilis* 로부터 pSBK203을 분리하여 제한효소에 의한 유전자 지도를 작성하고 Cm 저항성 유전자를 클로닝 하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

본 실험에 사용한 균주 및 plasmid 들은 Table 1에 나타나 있다. 운반체 plasmid 인 pBD9은 *B. subtilis* BD170을 형질전환 시킨 후 분리, 사용하였으며 pBR322는 형질전환된 *E.*

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Relevant genotype or phenotype	Reference or source
<i>S. aureus</i> D-H-1	Cm-r Em-r Km-r Tc-r Ap-r	Byeon et al. (1985)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr trp</i>	B. Weisblum
<i>E. coli</i> HB101	F-minus <i>recA13</i> <i>ara14 proA2 galK2</i>	G. Cooper
Plasmids		
pBD9	Km-r Em-r	
pBR322	Tc-r Ap-r	
pSBK203	Cm-r	Byeon et al. (1985)
pTQ16	Em-r Cm-r Km-r	present study
pHW15	Km-r	present study
pHW20	Tc-r Cm-r	present study

coli HB101에서 분리하여 사용하였다.

제한효소

제조합 plasmid의 조성 및 제한효소 인식부위를 판정하기 위하여 *Taq* I, *Msp* I, *Bgl* II, *Hinf* I, *Hind* III, T-4 DNA ligase 등의 제한효소를 사용하였다. 이들은 모두 New England Bio. Labs. (Beverly, MA USA)으로부터 구입하여 사용하였고 calf intestinal alkaline phosphatase (CIP)는 Pharmacia Molecular Biology Division에서 구입하였다. 이들 제한효소의 반응조건 및 사용방법은 제조회사의 지시에 따랐다.

시약 및 배지

배지에 사용된 시약은 Difco Laboratories (Detroit, Michigan USA)에서 구입하였고 DNA 분리와 정제에 사용한 시약, 항생제, lysozyme, RNase 등은 Sigma Chemical Co. (St. Lewis, Mo USA)에서 구입하여 사용하였다. 배지는 완전 배지로 *E. coli* HB101을 위한 LB 배지(Bacto-tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g, pH 7.6, distilled water 1l)와 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 를 위한 Staph 배지(Bactotryptone 5g, yeast extract 5g, 10% K₂HPO₄ 10 ml, 50% glucose 4 ml, distilled water 1l) 등이 각각 사용되었다. 최소배지로는 M9 배지(Maniatis 등, 1982)를 사용하였고 항생

제 저항성 균주를 선별하기 위한 배지로는 완전배지에 각각 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (kanamycin, chloramphenicol 및 erythromycin의 경우)이나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tetracycline)이 되도록 첨가하여 사용하였다.

Plasmid DNA 분리

재조합 plasmid 및 운반체 plasmid에 의하여 형질전환된 *B. subtilis* BD170으로부터 plasmid DNA를 분리하기 위하여 SDS-NaCl 방법(Guerry 등, 1973)을 사용하였으며 *S. aureus* D-H-1 (pSBK203)으로부터의 plasmid의 분리되는 lytic enzyme으로 lysozyme(4 mg/ml)과 lysostaphin(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 동시에 사용한 SDS-NaCl 방법(Guerry 등, 1973)을 다소 변형하여 사용하였다.

Agarose gel 전기영동

0.6%~1.5%의 agarose(Sigma, type I) mini gel(70×85 mm)을 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Et-Br이 포함된 TBE 완충용액에 수평으로 잠근 채 60V-80V로 1~3시간 전개하였다. 제한효소 절편의 분자량 측정을 위한 size marker로는 λ DNA를 *Hind* III로 자른 절편과 plasmid pBR322 DNA의 *Hinf* I 가수분해 절편을 사용하였다.

저항성 정도 측정

고체배지상의 저항성 정도 측정은 Staph 한천배지상에 항생물질 보관용액(10 mg/ml) 5 μl 을 백금니로 streaking 한 후 잘 흡수시키고 이와 교차하여 균주의 현탁액을 streaking 하여 12~18시간 배양한 후 성장저해부위의 폭을 대조구와 비교하였다.

*B. subtilis*의 형질전환

pSBK203 및 재조합 plasmid를 사용한 *B. subtilis*의 형질전환은 competent cell을 이용한 Dubnau 등(Dubnau 등, 1971)의 방법과 protoplast cell을 이용한 Chang and Cohen(Chang and Cohen, 1979)의 방법을 따랐다.

형질전환체의 선별 및 형질전환된 균주내의 plasmid를 확인하기 위하여 적절한 선택배지와 SDS-NaCl 방법(Guerry 등, 1973)에 의하여 plasmid를 분리 확인하였다.

재조합 plasmid의 구성

완전분해에 의한 재조합 DNA 구성은 DNA μg 당 1 unit의 제한효소로 2 시간 동안 가수분

해한 DNA 절편을, 부분분해에 의한 재조합 DNA 구성은 DNA μg 당 1 unit의 제한효소로 37°C~65°C에서 20~30분간 가수분해하여 만든 DNA 절편을 각각 사용하였고 운반체 DNA와 삽입체 DNA의 비율은 Dugaiczky(Dugaiczky 등, 1975)의 방법에 따라 약 1:3 정도가 되도록 하여 DNA μg 당 1 unit의 T4-DNA ligase를 처리하였다. 또한 자가접합을 최소로 하기 위하여 calf intestinal alkaline phosphatase를 DNA μg 당 1~2 unit로 처리한 후 DNA를 정제하여 T4-DNA ligase를 처리하였다.

제한효소 인식부위 결정

제한효소에 의한 가수분해는 총 반응용액 20 μl 에 1 μg 의 DNA와 각 효소가 포함되도록 하여 반응시켰으며 agarose gel에서 확인된 DNA 절편은 Novick(Novick 등, 1979)와 Perbal(Perbal, 1984) 등의 방법에 따라 제한효소 인식부위의 상대거리를 결정하였다.

결 과

Cm 저항성 유전자의 소재 확인

S. aureus D-H-1 균주내의 Cm 저항성 유전자의 소재를 결정하기 위하여 이미 보고된 바 있는

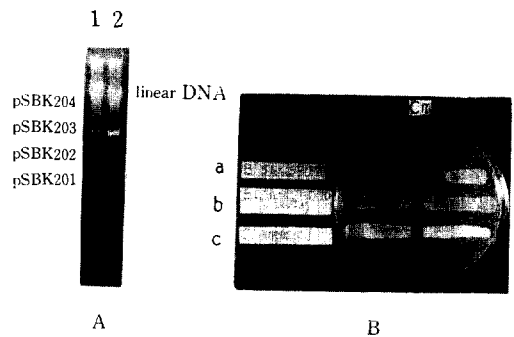


Fig. 1. Identification of chloramphenicol resistance.

(A) Agarose gel electrophoresis profiles of plasmid pSBK203 from original *S. aureus* D-H-1 strain (lane 1) and from *B. subtilis* BD170 strain transformed with pSBK203 (lane 2). (B) Antibiotic resistance of *B. subtilis* BD170 (a), *B. subtilis* BD170 (pSBK203) (b), and *S. aureus* D-H-1 (c).

ethidium bromide 및 acridine orange 를 사용한 curing 실험결과(Byeon 등, 1985)를 토대로 *S. aureus* D-H-1 균주로부터 plasmid 를 분리하여 *B. subtilis* BD170을 형질전환 시켰다. Fig.1에 나타난 바와 같이 *S. aureus* D-H-1 균주의 4 개 plasmid 들중 2.5×10^6 dal.인 plasmid (pSBK 203)가 *B. subtilis* BD170을 형질전환시켜 Cm 저항성이 나타나게 하였으며 따라서 이후의 pSBK 203은 의하여 형질전환된 *B. subtilis* BD170으로부터 pSBK203을 분리, 정제하여 사용하였다.

pSBK203의 제한효소 지도 작성

pSBK203상에 존재하는 제한효소 인식부위를

결정하기 위하여 pSBK203을 단일절편으로 자르는 *Bgl* II와 *Msp* I의 상대거리를 먼저 정하고 2~4개의 절편으로 자르는 *Hinf* I, *Hind* III, *Mbo* I, *Rsa* I, *Taq* I의 각 절편들을 다시 *Bgl* II와 *Msp* I으로 이중 절단한 후 각 절편들의 상대거리를 측정하였다(Table 2). 즉 *Hinf* I A 절편은 *Bgl* II에 의하여 3.5 kb 절편이 거의 차이없이 둘로 나누어 졌으며(Fig.6A, lane 4) *Msp* I에 의해서는 2.2 kb와 1.3 kb로 나누어 졌다(Fig.2A, lane 5). *Hind* III A 절편은 *Bgl* II 및 *Msp* I에 의하여 각각 1.52 kb와 1.2 kb 및 2.7 kb와 0.02 kb 크기의 절편으로 나누어 지고(Fig.2A, lane

Table 2. Restriction endonuclease fragment patterns generated by single and double digest of the plasmid pSBK203 (2.5Mdal) from *Staphylococcus aureus*.

Enzymes for single digest	Enzymes for double digest			
	<i>Bgl</i> II	<i>Msp</i> I	<i>Mbo</i> I	<i>Hind</i> III
<i>Hinf</i> I				
A	3.5 (3.4+0.1)	3.5 (2.2+1.3)		
B	0.2	0.2		
<i>Hind</i> III				
A	2.72 (1.52+1.2)	2.72 (2.7+>0.02)	2.72	
B	0.63	0.63	0.63 (0.2+0.43)	
C	0.35	0.35	0.35 (0.28+>0.07)	
<i>Mbo</i> I				
A	1.85	1.85 (1.6+0.25)		
B	1.6	1.6		
C	0.25	0.25		
<i>Rsa</i> I				
A	1.45	1.45		
B	1.25 (0.8+0.45)	1.25		
C	0.6	0.6		
D	0.38	0.38 (0.35+>0.03)		
<i>Dde</i> I				
A	2.22 (1.4+0.8)	2.22		
B	0.8	0.8 (0.7+0.1)		
C	0.53	0.53		
D	0.15	0.15		
<i>Taq</i> I				
A	1.0	1.0		1.0 (0.63+0.25+0.1)
B	0.67 (0.47+0.2)	0.67		0.67
C	0.62	0.62		0.62
D	0.62	0.62 (0.42+0.2)		0.62
E	0.31	0.31		0.31
F	0.24	0.24		0.24
G	0.14	0.14		0.14
H	0.1	0.1		0.1

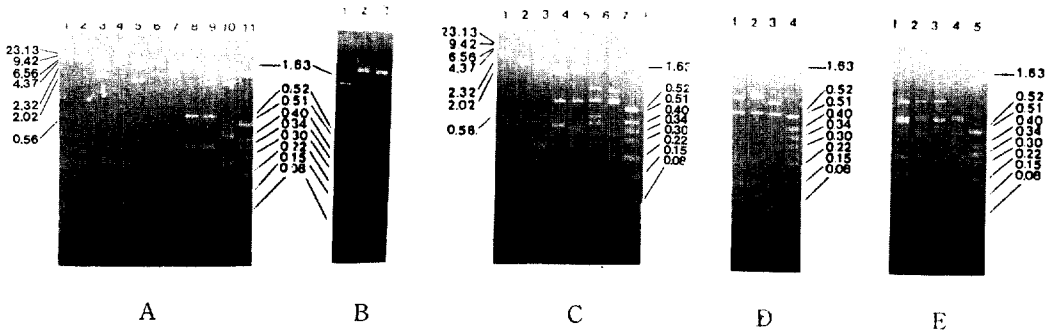


Fig.2. Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of the chloramphenicol resistance harbouring plasmid pSBK203.

(A) Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III); Lane 2, pSBK203; Lane 3, pSBK203+*Msp* I+*Bgl* III; Lane 4, pSBK203+*Hinf* I; Lane 5, pSBK203+*Msp* I+*Hinf* I; Lane 6, pSBK203+*Bgl* II+*Nci* I; Lane 7, pSBK203+*Bgl* II+*Nci* I+*Msp* I; Lane 8, pSBK203+*Hind* III; Lane 9, pSBK203+*Hind* III+*Bgl* II; Lane 10, pSBK203+*Hind* III+*Mbo* I; Lane 11, Size marker (pBR322+*Hinf* I). (B) Lane 1, Size marker (pBR322+*Hinf* I); Lane 2, pSBK203+*Hind* III; Lane 3, pSBK203+*Hind* III+*Msp* I. (C) Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III); Lane 2, pSBK203+*Mbo* I; Lane 3, pSBK203+*Mbo* I+*Msp* I; Lane 4, pSBK203+*Rsa* I; Lane 5, pSBK203+*Rsa* I+*Msp* I; Lane 6, pSBK203+*Rsa* I+*Bgl* II; Lane 7, pSBK203+*Rsa* I+*Hind* III; Lane 8, Size marker (pBR322+*Hinf* I). (D) Lane 1, pSBK203+*Dde* I; Lane 2, pSBK203+*Dde* I+*Bgl* II; Lane 3, pSBK203+*Dde* I+*Msp* I; Lane 4, Size marker (pBR322+*Hinf* I). (E) Lane 1, pSBK203+*Taq* I; Lane 2, pSBK203+*Taq* I+*Msp* I; Lane 3, pSBK203+*Taq* I+*Bgl* II; Lane 4, pSBK203+*Taq* I+*Hind* III; Lane 5, Size marker (pBR322+*Hinf* I).

9; Fig.2B, lane 3) *Mbo* I에 의하여 중간크기 및 가장 작은 절편이 각각 0.43 kb와 0.26 kb 크기 및 0.28 kb와 0.07 kb 크기의 절편으로 나누어 졌다(Fig.2A, lane 10). *Mbo* I 절편을 *Bgl* II로 절단하였을 경우 각 절편의 이동에 있어서 변화가 전혀 없었고 *Msp* I으로 절단하였을 때에는 가장 큰 절편이 0.6 kb와 0.25 kb 크기의 절편으로 잘라졌다(Fig.2C, lane 3). 또한 *Msp* I으로 절단한 절편들은 항상 *Nci* I으로 절단한 절편들과 동일한 전기영동상을 나타내었다(Fig.2A, lane 7).

한편 *Rsa* I의 4 개 절편은 두 번째 네 번째 큰 절편이 각각 *Bgl* II, *Msp* I에 의하여 1.4 kb와 0.8 kb 크기 및 0.7 kb와 0.1 kb 크기의 절편으로 이중절단 되었다(Fig.2C, lane 1, 2, 3)

8 개의 *Taq* I 절편은 0.67 kb 절편이 *Bgl* II에 의하여 0.47 kb와 0.2 kb 크기의 절편으로, 0.62 kb 절편이 *Msp* I에 의하여 0.42 kb와 0.2 kb 크기의 절편으로 나누어 졌으며 *Hind* III에 의하여 가장 큰 절편인 1.0 kb 크기의 절편이 0.63 kb, 0.34 kb 및 0.1 kb 크기의 절편으로 이중절단 되었다(Fig.2E, lane 1, 2, 3, 4).

Cm 저항성 유전자의 cloning 과 제한효소 인식 부위 결정

pSBK203상의 Cm 저항성 유전자를 운반체 plasmid인 pBD9에 옮기기 위하여 *Taq* I으로 pSBK203을 DNA μ g 당 0.5 unit의 농도로 30 분간 부분가수분해한 후 pBD9의 선별인자인 Km, Em을 불활성 시키지 않는 *Cla* I 단일절편에 T4-DNA ligase로 접합시키고 *B. subtilis* BD170 내로 형질전환 시켰다. 이때 얻어진 형질 전환체 중 Cm 저항성 및 운반체 plasmid의 선별 인자인 Km, Em에 대하여 모두 저항성을 갖는 균주를 분리하였으며, 여기서 확인된 재조합 plasmid를 pTQ16 이라고 명명하였다. 삽입된 DNA 절편은 약 1.3 kb이었으며 삽입절편내의 제한효소 인식부위는 *Taq* I, *Bgl* II, *Hinf* I 등이 존재하였다. 즉 *Taq* I에 의하여 부분분해된 절편인 0.63 kb와 0.67 kb 절편이 함께 결합하여 pBD9에 cloning 되어 있었으며(Fig.5) 0.67 kb *Taq* I 절편내에 *Bgl* II 인식부위가 존재하였다(Fig.4, Fig.6). 삽입절편 내에는 *Hinf* I에 의해 약 0.2 kb의 절편을 만드는 인식부위가 *Bgl* II 인

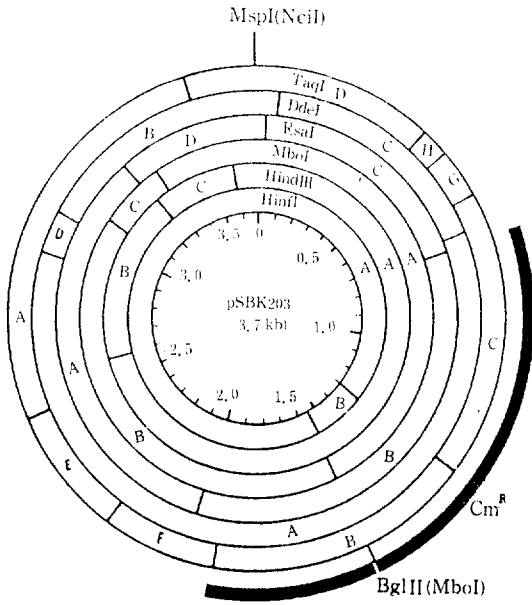


Fig.3. Restriction endonuclease cleavage map of pSBK203 (2.5Mdal) plasmid from *Staphylococcus aureus*.

식부위에 매우 근접하여 존재하는 것으로 나타났으며(Fig.6) 운반체 plasmid인 pBD9상에 존재하는 0.7kb 크기의 *Hinf I* 절편외에도 같은 크기의 두개의 절편이 절편삽입으로 더 만들어 지는 것으로 믿어진다(Fig.5, Fig.6).

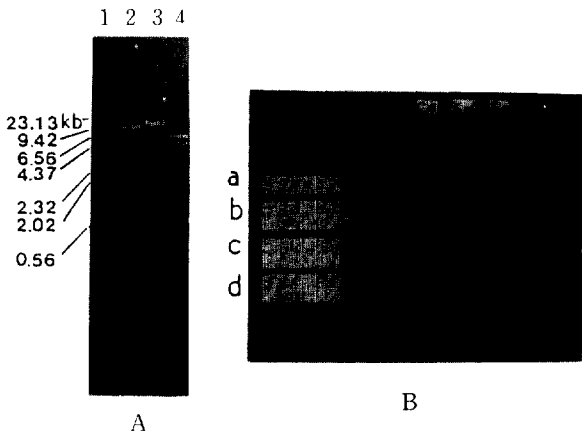


Fig.4. (A) Agarose gel electrophoresis profile of vector (pBD9) and recombinant (pTQ16) plasmid. Lane 1, Size marker (λ +*Hind III*); Lane 2, Vector plasmid (pBD9, 8.2 kb); Lane 3, recombinant plasmid (pTQ16, 10.5 kb); Lane 4, pTQ16+*Bgl II*. (B) Antibiotic resistance of *B. subtilis* BD170 (a), *B. subtilis* BD170(pSBK203) (b), *B. subtilis* BD170(pBD9) (c), and the recombinant plasmid harbouring *B. subtilis* BD170 (pTQ16) (d). (C) Schematic diagram of pTQ16 construction.

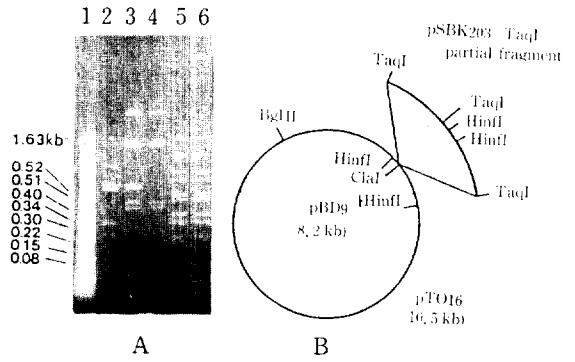
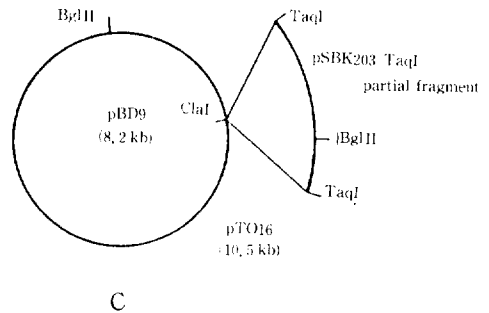


Fig.5. (A) Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of plasmids. Lane 1, Size marker (pBR322+*Hinf I*); Lane 2, pSBK203+*Taq I*; Lane 3, pTQ16+*Taq I*; Lane 4, pBD9+*Taq I*; Lane 5, pBD9+*Hinf I*; Lane 6, pTQ16+*Hinf I*. (B) Schematic diagram and restriction enzyme recognition sites of pTQ16.

pSBK203상의 Cm 저항성 유전자 위치결정

pSBK203으로부터 pBD9에 삽입된 DNA 절편 내에 Cm 저항성 유전자가 존재하는 지를 결정짓기 위하여 pSBK203상에 존재하는 *Bgl II* 인식부위를 절단하여 선상 DNA를 만들고 pBD9의 Km 저항성을 불활성 시키는 *Bgl II* 인식부위로 단일 절편을 만든 pBD9을 1:1로 혼합하여 연결시킨



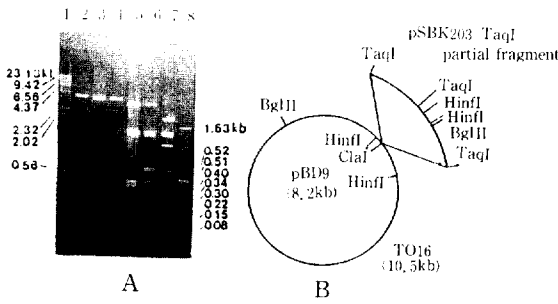


Fig.6. A- Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of plasmids.

Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III); Lane 2, pSBK203+*Bgl* II; Lane 3, pSBK203+*Hinf* I; Lane 4, pSBK203+*Bgl* II+*Hinf* I; Lane 5, pBD9+*Taq* I; Lane 6, pTQ16+*Taq* I; Lane 7, pTQ16+*Taq* I+*Bgl* II; Lane 8, Size marker (pBR322+*Hinf* I).

후 *B. subtilis* BD170을 형질전환 시켰다. Km, Cm에 대하여 감수성이면서 Em에 대해서만 저항성을 나타내는 선별된 균주는 pSKB203과 pBD9의 재조합 plasmid를 가진 것으로 보고 이 plasmid를 pHW15로 명명하였다 (Fig.7B).

또한 *E. coli* 운반체 plasmid인 pBR322의 ampicillin(Amp) 저항성만을 불활성시키는 *Sca* I 단일절편에 pSBK203의 4 개 *Rsa* I 가수분해 절편을(Fig.8) 혼합하여 연결시킨 후 *E. coli* HB 101

에 형질전환 시켰다. 이때 Tc(50 μ g/ml)와 Cm(20 μ g/ml)이 첨가된 Staph 배지에서 성장하는 균체중 Amp(50 μ g/ml)이 첨가된 배지에서 자라지 못하는 균체를 분리하고(Fig.8B) 이들로부터 plasmid를 추출하여 확인한 결과 *Bgl* II 인식부위를 포함한 1.3 kb *Rsa* I 절편이 삽입되어 있었다(Fig.8A).

고찰

S. aureus D-H-1의 Cm 저항성은 이 균주가 갖는 4 개의 plasmid들 중 2.5×10^6 dal(3.7kb)인 plasmid pSBK203상에 존재하는 것으로 나타났다. 이 결과는 이미 보고된 바 있는 Byeon 등의 실험결과(Byeon 등, 1985)와 동일하며 Shaw, Lacey(Shaw and Brodsky, 1968; Lacey, 1975) 등에 의하여 보고된 것처럼 현재까지의 모든 *S. aureus*에서 분리된 Cm 저항성은 plasmid 상에 존재한다는 결과와 일치하고 있다.

S. aureus D-H-1에서 분리되어 Cm 저항성 유전자가 존재하는 것으로 확인된 2.5×10^6 dal인 pSBK203상의 Cm 저항성 유전자 위치를 결정하기 위하여 먼저 이 plasmid를 단일절편으로 만드는 *Msp* I과 *Bgl* II 인식부위의 거리를 정하고 *Msp* I을 기준으로 하여 각 제한효소의 상대거리를

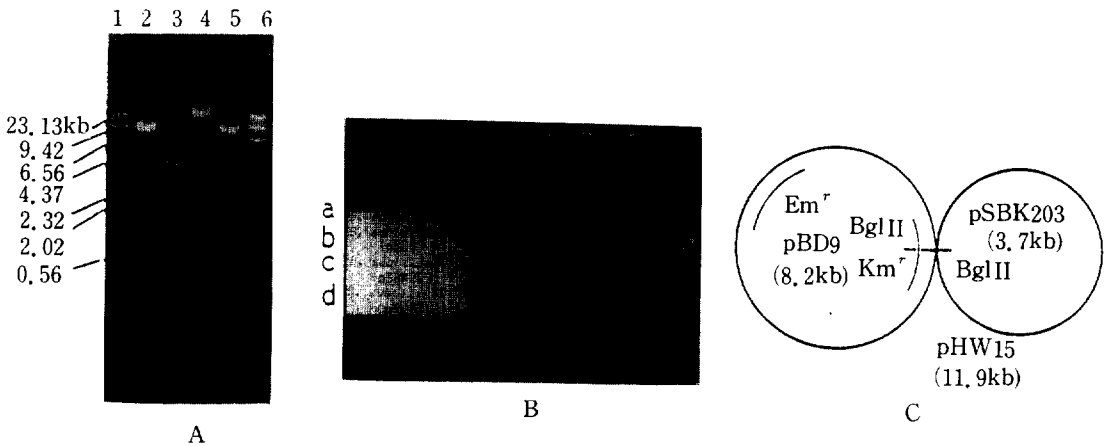


Fig.7. Insertional inactivation of the chloramphenicol resistance gene at the *Bgl* II site with pBD9.

(A) Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of plasmids. Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III); Lane 2, pBD9; Lane 3, pSBK203; Lane 4, pHW15; Lane 5, pHW15+*Bgl* II; Lane 6, Size marker (λ +*Hind* III). (B) Antibiotic resistance of *B. subtilis* BD170(a), *B. subtilis* BD170(pBD9) (b), *B. subtilis* BD170(pSBK203) (c), and *B. subtilis* BD170(pHW15) (d). (c) Schematic diagram of pHW15 construction.

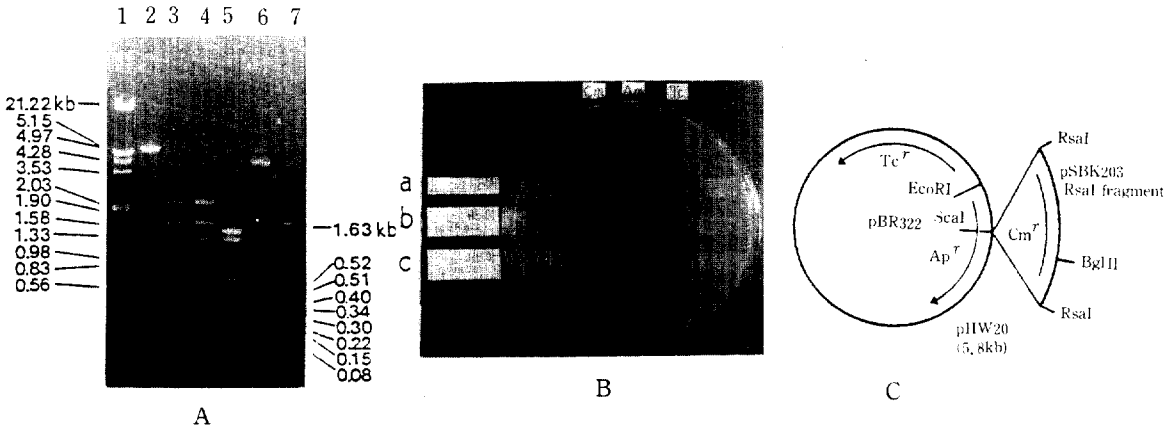


Fig.8. Identification of the chloramphenicol resistance gene.

(A) Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of plasmids. Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III + *Eco*RI); Lane 2, pHW20; Lane 3, pBR322 + *Rsa*I; Lane 4, pHW20 + *Rsa*I; Lane 5, pSBK203 + *Rsa*I; Lane 6, pHW20 + *Bgl* II + *Eco*RI; Lane 7, Size marker (pBR322 + *Hinf* I). (B) Antibiotic resistance of *E. coli* HB 101 (a), *E. coli* HB 101 (pBR322) (b), and *E. coli* HB 101(pHW20) (c). (C) Schematic diagram of pHW20 construction.

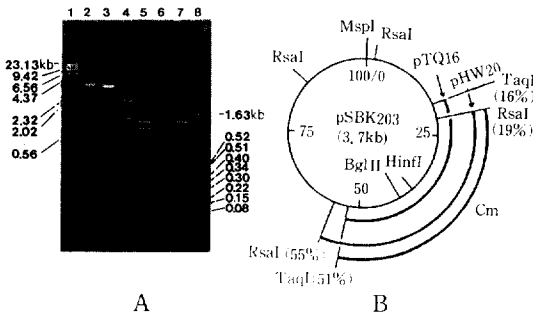


Fig.9. Position and restriction enzyme map of the CAM resistance gene on pSBK203.

(A) Agarose gel electrophoresis profile of restriction enzyme digests of pSBK203. Lane 1, Size marker (λ +*Hind* III); Lane 2, pSBK203; Lane 3, pSBK203 + *Hinf* I; Lane 4, pSBK203 + *Bgl* II + *Msp* I; Lane 5, pSBK203 + *Rsa* I; Lane 6, pSBK203 + *Rsa* I + *Msp* I; Lane 7, pSBK203 + *Rsa* I + *Bgl* II; Lane 8, Size marker (pBR322 + *Hinf* I). (B) The unique *Msp* I site on pSBK203 was chosen as the point of reference (1%) on the map. Map units is percentage of the total plasmid length (3.7 Kb). The unique *Bgl* II site (42%) is present within the CAM resistance gene because CAM-resistance is insertionally inactivated at this position.

결정하였다. 즉 pSBK203을 *Bgl* II와 *Msp* I으로 동시에 절단하였을 경우 나타난 1.55 kb와 2.15 kb 절편크기로 위치를 정한 후 나머지 인식부위들의 위치를 결정하였다(Fig.3, Table 2). *Mbo* I에 의하여 만들어지는 세 절편중 가장 큰 A 절편을 *Msp* I이 1.6 kb 크기와 0.25 kb 크기의 절편으로 자르며 *Bgl* II에 의해서는 *Mbo* I 절편이 더 이상 잘리지 않는 것으로 보아서 *Bgl* II 인식부위와 *Mbo* I이, A,B 절편으로 나누는 인식부위가 동일한 것으로 추측된다. 또한 *Nci* I에 의하여 절단된 절편의 전기영동상과 *Msp* I 및 *Nci* I으로 동시에 절단된 절편의 전기영동상이 동일한 것으로 보아서(Fig.2A, lane 6, 7) pSBK203상의 *Nci* I 염기서열은 *Msp* I 염기서열을 포함하는 것으로 생각된다.

8 개의 *Taq* I 인식부위는 0.62 kb 절편이 *Msp* I에 의하여 잘려진 후에도 계속 남아있는 것으로 보아(Fig.2E, lane 2) 동일한 크기의 절편이 두개 존재하는 것으로 보이며, *Bgl* II에 의하여서는 0.67 kb 절편이 0.47 kb 크기와 0.2 kb 크기의 절편으로 나누어 졌다. 따라서 0.67 kb와 0.62 kb 내에 *Bgl* II 및 *Msp* I 인식부위가 존재할 것으로 보인다. 또한 pSBK203의 *Taq* I 절편중 가장 큰 1.

0 kb 절편만이 *Hind* III에 의하여 3 개의 절편으로 나누어지는 것으로 보아서 *Hind* III 인식부위가 위치하는 2.5 kb 위치에서 3.5 kb 위치 사이에 1.0 kb *Taq* I 절편이 위치할 것으로 보인다(Fig.2E, lane 4).

Msp I에 의하여 절단되는 0.62 kb *Taq* I 절편을 제외한 또 하나의 0.62 kb 절편 위치는 8 개 *Taq* I 절편을 부분분해하여 Cm 저항성 유전자를 cloning 하였을 때 *Bgl* II 인식부위를 포함하는 0.67 kb 절편과 함께 존재하는 것으로 나타났으므로 (Fig.5, Fig.6) 0.67 kb 절편에 인접하여 위치할 것으로 추측된다. 그러나 *Taq* I 절편 중 0.31 kb, 0.24 kb, 0.14 kb, 0.1 kb 절편의 위치는 정확히 결정하지 못하였다.

pTQ16내에 삽입되어 있는 *Taq* I 부분절편과 0.1 kb 엇갈림이 있는 1.3 kb *Rsa* I 단일절편을 pBR322의 *Sca* I 인식부위에 삽입시킨 재조합 plasmid(pHW20)도 Cm에 대하여 저항성을 가지고 있었을 뿐 아니라 pTQ16상의 *Taq* I 부분절편에서와 마찬가지로 *Rsa* I 단일절편에도 *Bgl* II 인식부위가 존재하였는데 pSBK203의 *Bgl* II에 의한 선상 plasmid를 pBD9의 Km 저항성만을 불활성 시키는 *Bgl* II에 의한 선상 plasmid에 결합시켜 만든 pHW15가 Km Cm 모두에 감수성이면서 Em에만 저항성을 가지고 있는 것으로 보아 (Fig.7) Cm 저항성 구조 유전자는 *Bgl* II 인식부위를 포함하는 1.2 kb 이내에 존재할 것으로 추측

된다(Fig.9).

이 결과는 *S. aureus* 에서 동일하게 분리된 Cm 저항성 유전자인 pC194(Horinouchi and Weisblum, 1982)와 pC221(Wilson 등, 1981)이 각각 1.1 kb 이내에서 cloning 된 결과와 비교하면 pSBK203상의 1.2 kb 내에 위치하는 Cm 저항성 유전자는 Cm 저항성을 나타내는데 필요한 최소단위에 가까운 크기라고 생각된다. 또한 1.2 kb 이내에 존재하는 제한효소 인식부위를 이미 보고된 Cm 저항성 유전자상의 제한효소 인식부위와 비교하여 보았을 때, pC194나 pC221상의 Cm 저항성 유전자에는 존재하지 않는 *Bgl* II *Taq* I 등의 제한효소 인식부위가 위치하였으며, *cat*-86 상에 존재하는 *Xba*, I, *Bcl* I, *Hind* III의 제한효소 인식부위가 존재하지 않는 것으로 보아서 기존의 Cm 저항성 유전자와는 염기서열에 있어서 상이한 유전자로 보여진다.

본 연구는 앞으로 Cm 저항성에 관여하는 유전자 산물이 기존으로 알려진 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)에 의한 것인지의 여부 및 Cm 저항성 유전자의 발현양상 등을 고찰할 것이며 아울러 Cm 저항성 유전자의 염기서열 결정에 의하여 조절유전자 및 구조유전자의 특징 등을 기존으로 알려진 CAT 유전자의 것과 비교연구함으로써 근본적 Cm 저항성 유발기작의 밝힘에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

항생제에 대하여 다중 저항성을 갖는 *Staphylococcus aureus* D-H-1으로부터 chloramphenicol(Cm) 저항성 유전자를 가진 것으로 확인된 R-plasmid(pSBK203, 2.5Mdal.)를 분리하여 *Bacillus subtilis* BD170 내에서 발현시켰으며 이 Cm 저항성 유전자를 cloning 하기 위하여 pSBK203상의 제한효소 인식부위를 결정하였다.

pSBK203 상의 *Taq* I 부분절편(1.3 kb)을 pBD9의 *Cla* I 인식부위내에 삽입하여 얻은 재조합 plasmid(pTQ16)와 *Taq* I 부분절편과 0.1 kb 엇갈림이 있는 *Rsa* I 단일절편(1.3 kb)을 pBR322의 *Sca* I 인식부위에 삽입하여 얻은 재조합 plasmid(pHW20)에서 Cm 저항성이 획득되었다.

pBD9 및 pBR322 상에 삽입된 두 절편내에 *Hinf* I, *Taq* I 및 *Bgl* II의 제한효소 인식부위가 존재하였으며 이들 중 *Bgl* II 인식부위에 의하여 Cm 저항성이 불활성 되었다.

REFERENCES

1. Alton, N.K., and D. Vapnek. 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature*, 282, 864-866.
2. Byeon, W.H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea, and S.J. Hong. 1985. R

- plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 282-290.
3. Byeon, W.H., and B. Weisblum. 1984. Post-transcriptional regulation of chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.*, **158**, 543-550.
 4. Chang, S., and S.N.C. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111-115.
 5. Charles, J.D., and J.F. Timothy. 1985. Post transcriptional regulation of the inducible nonenzymatic chloramphenicol resistance determinant of IncP plasmid R26. *J. Bacteriol.*, **161**, 147-152.
 6. Clewell, D.B. 1981. Conjugation and resistance transfer in Streptococci and other gram positive species: Plasmids sex pheromones and conjugative transposons. in: *Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids*, S.B. Levy, R.C. Clowes, and E.L. Koenig Plenum, New York.
 7. Dubnau, D., and R. Davidoff-Abelson. 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.*, **56**, 209-221.
 8. Dugaiczky, A., H.W. Boyer, and H.M. Goodman. 1975. Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.*, **96**, 171-184.
 9. Duvall, E.J., D.M. Williams, P.S. Lovett, C. Rudolph, N. Vasantha, and M. Guyer. 1983. Chloramphenicol-inducible gene expression in *Bacillus subtilis*. *Gene*, **24**, 171-177.
 10. Duvall, E.J., D.M. Williams, S. Mongkolsuk, and P.S. Lovett. 1984. The region that control expression of two chloramphenicol-inducible cat genes cloned in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **158**, 784-790.
 11. Duvall, E.J., S. Mongkolsuk, U.J. Kim, P. S. Lovett, T.M. Henkin, and G.H. Chambliss. 1985. Induction of the chloramphenicol acetyltransferase gene cat-86 through the action of the ribosomal antibiotic ampicillin: involvement of a *Bacillus subtilis* ribosomal component in cat induction. *J. Bacteriol.*, **161**, 665-672.
 12. Ehrlich, S.D. 1977. Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1680-1682.
 13. Fitton, J.E. and W.V. Shaw. 1979. Comparison of chloramphenicol acetyltransferase variants in *Staphylococcus*. Purification, inhibitor studies and N-terminal sequences. *Biochem. J.*, **177**, 575-582.
 14. Gryczan, T.J., S. Contente, and D. Dubnau. 1980. Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA recombination resident plasmid in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*, **177**, 459-467.
 15. Gryczan, T.J., and D. Dubnau. 1978. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1428-1432.
 16. Gryczan, T., A.G. Shivarkumar, and D. Dubnau. 1980. Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **141**, 246-253.
 17. Guerry, P., D.J. LeBlanc, and S. Falkow. 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, **116**, 1064-1066.
 18. Harwood, C.R., D.M. Williams, and P.S. Lovett. 1983. Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene*, **24**, 163-169.
 19. Horinouchi, S., and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specify inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.*, **150**, 815-825.
 20. Iordanescu, S. 1977. Relationships between cotransducible plasmids in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **129**, 71-75.

21. Lacey, R.W. 1975. Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Reviews*, **3**, 91-32.
22. Linda, M.A. T.M. Henkin, G.H. Chambliss, and K.F. Bott. 1984. New chloramphenicol resistance locus in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **158**, 386-388.
23. Lovett, P.S., D.M. Williams, and E.J. Duvall. 1982. Expression of foreign procaryotic gene in *Bacillus subtilis*, Genetic Chemical, 51-57, Plenum Press, New York.
24. Luria, S.E., J.N. Adams, and R.C. Ting. 1960. Ttransduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and properties of the transducing phage particles. *Virology*, **12**, 384-390.
25. Macrina, F.L., K.R. Jones, and P.H. Wood. 1980. Chimeric Streptococcal plasmids and their use as molecular cloning vehicles in *Streptococcus sanguis*(Challis). *J. Bacteriol.*, **143**, 1425-1435.
26. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Rapid isolation of plasmid or bacteriophage lambda DNA. in: Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbour Lab.
27. Meynell, G.G. 1972. The discovery of plasmids in: Bacterial plasmid. The M.I. T. press.
28. Nicholas, P.A., M. Skorn, J.D. Kaufman, and P.S. Lovett. 1985. Chloramphenicol-induced translation of cat-86 mRNA requires two cis-acting regulatory regions. *J. Bacteriol.*, **164**, 696-703.
29. Novick, R.P. 1963. Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **33**, 121-136.
30. Novick, R.P., E. Murphy, T.J. Gryczan, E. Baron, and I. Edelman. 1979. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: Restriction deletion maps. *Plasmid*, **2**, 109-129.
31. Novick, R.P., and R. Brodsky. 1972. Studies on plasmid replication. I. Plasmid incompatibility and establishment in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.*, **33**, 285-302.
32. Perbal, B. 1984. Ordering the restriction DNA fragments in: A practical guide to molecular cloning. John Wiley & Sons, Inc. 207-217.
33. Shaw, W.V., L.C. Packman, B.D. Burleigh, A. Dell, H.R. Morris, and B.S. Hartley. 1979. Primary structure of chloramphenicol acetyltransferase specified by R-plasmids *Nature*, **282**, 870-871.
34. Shaw, W.V., and R.F. Brodsky. 1968. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **95**, 28-36.
35. Watanabe, T. 1967. Evolutionary relationships of R factors with other episomes and plasmids. *Fed. Proc.* **26**, 23-28.
36. Watanabe, T., T. Arai, and T. Hattori. 1970. Effects of cell wall polysaccharide on the mating ability of *Salmonella typhimurium*. *Nature*, **225**, 70-71.
37. Watanabe, T., and C. Ogata. 1966. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IX. Recombination of an R factor with F. *J. Bacteriol.*, **91**, 43-50.
38. Wilson, C.R., S.E. Skinner, and W.V. Shaw. 1981. Analysis of two chloramphenicol resistance plasmids from *Staphylococcus aureus*: Insertional inactivation of Cm resistance, mapping of restriction sites and construction of cloning vehicle *Plasmid*, **5**, 245-258.
39. Wilson, C.R., and J.N. Baldwin. 1978. Characterization and construction of molecular cloning vehicles within *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **136**, 402-413.

(Received Nov. 15, 1986)