

다제내성 황색포도상구균이 가지고 있는 클로람페니콜 내성 플라스미드의 동정

이대운 · 문경호[#]

경성대학교 약학대학

(Received September 15, 1993)

Characterization of Chloramphenicol Resistant Plasmid of Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Dae Woon Lee and Kyung Ho Moon[#]

College of Pharmacy, Kyungsoong University, Daeyun-dong 110-1, Nam-Ku, Pusan 608-736, Korea

Abstract—The clinical isolate *Staphylococcus aureus* SA2 had four kinds of plasmids and was resistant to ampicillin, chloroamphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, methicillin, streptomycin, tetracycline and tobramycin. Transformation experiment demonstrated that 4.14 kb plasmid(pKH7) encoded resistance to chloramphenicol. The cleavage map of pKH7 was determined by restriction enzyme mapping techniques. The cleavage map is given for *Bst*EII, *Hind*III, *Hpa*II, and *Xba*I. The above restriction endonucleases have a single site, but nucleases *Bam*HI, *Bgl*I, *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hpa*I, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, and *Xho*I have no site on this plasmid.

Keywords □ Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, protoplast transformation, chloramphenicol resistance plasmid, restriction map.

임상에서 분리한 *Staphylococcus aureus* SA2는 엠피실린, 클린다마이신, 클로람페니콜, 에리스로마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 메치실린, 스트렙토마이신, 테트라사이클린, 토부라마이신에 대하여 내성을 보이는 다제내성 균이다.¹⁾ 저자 등은 원형질체형질전환법을 이용하여 위의 황색포도상구균으로부터 엠피실린, 클린다마이신, 에리스로마이신, 가나마이신, 스트렙토마이신의 내성을 매개하는 플라스미드 pKH2를 분리 동정하였다.²⁾ 본 논문에서는 클로람페니콜의 내성을 매개하는 플라스미드를 분리 동정하였기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

항생제—엠피실린(Am)은 영진약품, 클로람페니콜

(Cm), 에리스로마이신(Em), 스트렙토마이신(Sm), 옥시테트라사클린(Tc)은 종근당, 클린다마이신(CI)은 한국업존, 메치실린(Mc)은 대한약품공업, 겐타마이신(Gm)은 동신제약, 가나마이신(Km)은 동아제약, 토부라마이신(Tm)은 대웅제약 제품을 시중에서 구입하여 사용하였으며 이중 Cm과 Em은 에탄올로 추출하여 사용하였다.

배지—황색포도상구균의 배양에는 Tryptic soy broth(TSB)와 TSA(TSB + 1.5% agar)를 사용하였으며 형질전환시 재생배지로는 DM3를 사용하였다.²⁾

실험균주—형질전환을 위한 수용균주로는 *Staphylococcus aureus* RN4220을 사용하였으며 내성균주로는 임상분리균주 *Staphylococcus aureus* SA2를 사용하였다.

제한효소—Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

플라스미드 분리—alkaline lysis법을 변형하여 사용하였다.²⁾

형질전환—Chang과 Cohen의 방법을 변형하여 사용하였다.²⁾ *S. aureus* RN4220을 형질전환시킨 후에 내성균주를 선별할 때의 top agar는 Cm을 200 µg/ml 농도로 함유한 HB/TSA 5 ml을 사용하였다.

제한효소처리 및 전기영동—*Bam*HI, *Bgl*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I를 사용하여 single digestion을 실시하였으며 이 중에서 *Bst*EII, *Hind*III, *Hpa*II, *Xba*I를 사용하여 double digestion을 실시하였다. 전기영동은 1.0% agarose gel을 사용하여 실시하였으며 전압은 1 v/cm로, 완충용액은 TBE(pH 8.3, 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하였다. EtBr로 염색하여 관찰하고 polaroid film type 667을 사용하여 사진을 찍었다. 전기영동 시에 molecular marker로는 *Hind*III/*Eco*RI-double digested λ-DNA와 *Hind*III-digested λ-DNA를 사용하였다.

결 과

형질전환—항생제 다제내성을 갖고 있는 *S. aureus* SA2로부터 플라스미드를 분리하여 내성이 없는 *S. aureus* RN4220을 형질전환시키고 Cm을 함유하고 있는 배지에서 배양한 결과 Cm내성을 보이는 *S. aureus* RN4220형질전환체를 얻을 수 있었다. 이 형질전환체를 Cm이 50 µg/ml 들어있는 TSB에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고 1.0% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 플라스미드 양상을 비교하였다 (Fig. 1). *S. aureus* SA2는 4개의 플라스미드를 가지고 있었는데 이중 아래에서 두번째의 플라스미드를 *S. aureus* RN4220 Cm내성 형질전환체에서 발견할 수 있었으며 따라서 이 플라스미드가 Cm내성을 매개함을 알 수 있었다. 형질전환을 통하여 얻어진 *S. aureus* RN4220 Cm 내성 형질전환체를 *S. aureus* KH7으로, 그리고 이 균주가 가지고 있는 Cm내성 플라스미드를 pKH7이라 명명하였다. pKH7이 매개하는 다른 내성을 확인하기 위하여 *S. aureus* KH 7을 Am(10 µg/ml), Cl(30 µg/ml), Em(50 µg/ml), Gm(50 µg/ml), Km(50 µg/ml), Mc(40 µg/ml), Sm(50 µg/ml), Tc(50 µg/ml), Tm(40 µg/ml)이 각각 함유된 TSB에서 배양한 결과 pKH7은 Cm내성만을 매개하였다.

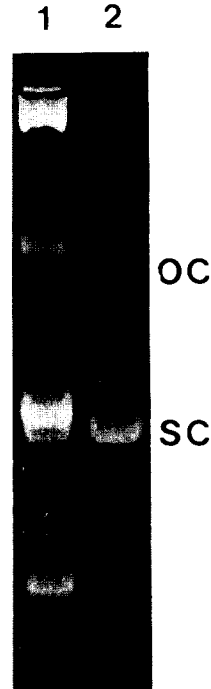


Fig. 1—Agarose gel electrophoresis of rapidly isolated *S. aureus* plasmids.

Lane 1, plasmids of *S. aureus* SA2; lane 2, supercoiled(SC) and open circular(OC) pKH7 of *S. aureus* KH7

제한효소의 처리—*S. aureus* KH 7에서 분리한 pKH7을 *Bam*HI, *Bgl*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I으로 처리한 다음 전기영동을 실시하였다. *Bst*EII, *Hind*III, *Hpa*II, *Xba*I은 한개의 제한효소부위를 가지고 있었으나(Fig. 2) 다른 제한효소들은 제한효소부위를 가지고 있지 않았다. 제한효소지도를 작성하기 위하여 *Bst*EII, *Hind*III, *Hpa*II, *Xba*I을 조합하여 double digestion을 실시하고 전기영동하였다(Fig. 3).

제한효소지도—pKH7의 제한효소지도를 작성하기 위하여 이 플라스미드를 여러가지 제한효소로 single 혹은 double digestion을 실시하여 얻어진 조각들의 길이를 결정하였다. 이때 λ-DNA를 *Hind*III로 처리하거나 혹은 *Eco*RI과 *Hind*III로 double digestion시켜 얻어진 조각들을 molecular marker로 사용하였다. 위에서 구한 각 조각들의 길이를 이용하여 제한효소

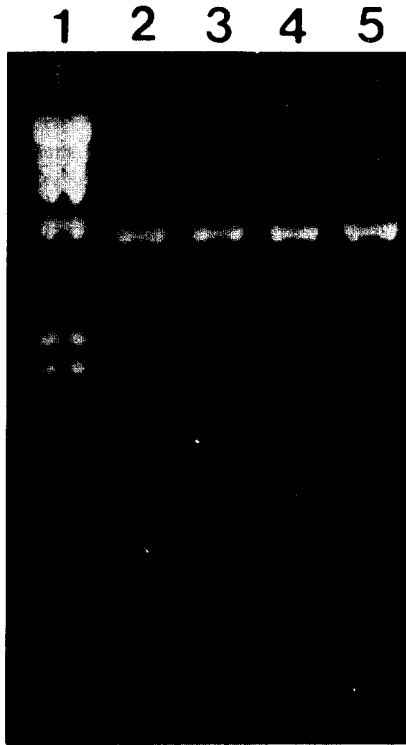


Fig. 2—Agarose gel electrophoresis of pKH7 digested with the restriction endonucleases. Lane 1, λ -DNA digested with *Hind*III; Lane 2, pKH7 digested with *Bst*EII; lane 3, pKH7 digested with *Hind*III; lane 4, pKH7 digested with *Hpa*II; lane 5, pKH7 digested with *Xba*I.

지도를 작성하였으며, pKH7의 길이는 4.14 kb로 계산되었다(Fig. 4).

고 찰

S. aureus SA2는 10개의 항생제(Am, Cl, Cm, Em, Gm, Km, Mc, Sm, Tc, Tm)에 내성을 보이는 다제내성균이다. 일반적으로 내성은 염색체의 돌연변이에 기인하거나 내성 유전자를 가지고 있는 플라스미드에 의해서 나타난다.³⁾ 저자 등은 *S. aureus* SA2가 가지고 있는 4개의 플라스미드와 이 균이 가지고 있는 내성과의 관계를 규명하기 위하여 원형질체 형질전환법을 실시하였다. 그 결과 Am, Cl, Em, Km, Sm에 내성을 나타내는 pKH2를 분리 동정하여 보고한 바 있다.²⁾

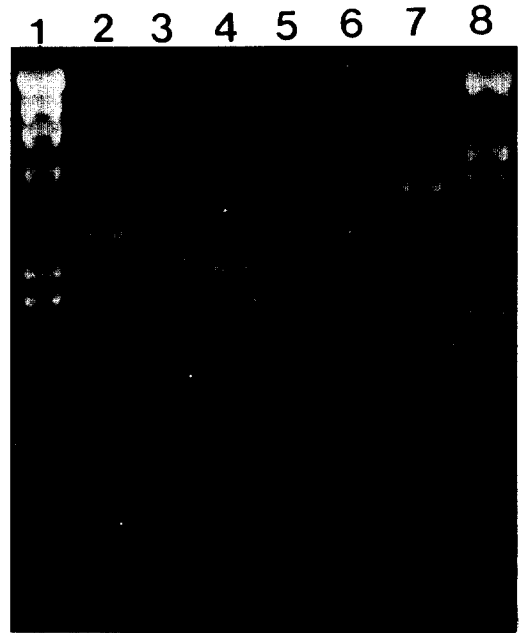


Fig. 3—Agarose gel electrophoresis of pKH7 double digested with the restriction endonucleases. Lane 1, λ -DNA with *Hind*III; Lane 2, pKH7 digested with *Bst*EII and *Hind*III; lane 3, pKH7 digested with *Bst*EII and *Hpa*II; lane 4, pKH7 digested with *Bst*EII and *Xba*I; lane 5, pKH7 digested with *Hind*III and *Hpa*II; lane 6, pKH7 digested with *Hind*III and *Xba*I; lane 7, pKH7 digested with *Hpa*II and *Xba*I; lane 8, λ -DNA digested with *Eco*RI and *Hind*III.

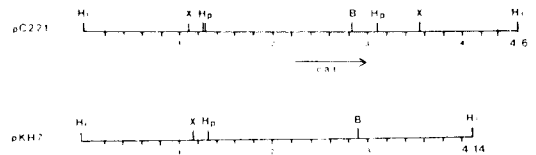


Fig. 4—Restriction maps of the staphylococcal Cm plasmids pC221 and pKH7. Restriction sites are indicated by B(*Bst*EII), Hi(*Hind*III), Hp(*Hpa*II), X(*Xba*I). Map coordinate is expressed in kilobases.

본 논문에서는 동일한 방법에 의하여 Cm내성을 나타내는 플라스미드(pKH7)를 분리 동정할 수 있었다(Fig. 1, 4).

Cm은 50S ribosomal subunit와 결합함으로써 단백질 합성 과정 중 transpeptidation 단계를 방해하여 정균작용을 일으키는 항생제로 알려져 있다.⁴⁾ 황색포도상구균에 있어서 Cm에 대한 내성은 Cm이 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)의 작용에 의하여 acetyl coenzyme A과 반응하여 아세틸화 됨으로서 무독화되기 때문인 것으로 알려져 있는데 황색포도상구균의 경우 적어도 5종류의 CAT가 있는 것으로 보고되었다.^{5,6)}

황색포도상구균에 있어서 Cm 내성은 전적으로 크기가 2.9~5.1 kb의 multicopy 플라스미드에 의해서 매개된다.⁷⁻¹³⁾ 이 플라스미드들은 DNA-DNA hybridization 혹은 restriction endonuclease analysis에 의해서 3종류로 분류가 되는데 각각의 prototype은 pC194, pC221, pC223으로 알려져 있다.¹⁴⁾ *S. aureus* SA2에서 분리한 pKH7의 제한효소지도를 작성하고 위의 prototype의 제한효소지도와 비교해 본 결과 pKH7은 크기는 약간 작지만 pC221계열의 플라스미드임을 알 수 있었다(Fig. 4). 현재까지 Gram 양성균과 Gram 음성균이 가지고 있는 13개의 cat 유전자의 염기배열이 결정되어 보고된 바 있는데¹⁵⁾ pKH7의 전체적인 염기배열이 밝혀진다면 cat 유전자 뿐만 아니라 이 플라스미드의 여러가지 특성을 이해하는데 도움을 줄 것으로 사려된다.

문 헌

- 1) 강재선, 문경호: 황색포도상구균의 항생제 내성 양성, 약학회지 **34**, 122-125 (1990).
- 2) 김기현, 이대운, 문경호: 황색포도상구균의 항생제 다제내성을 나타내는 플라스미드의 동정, 약학회지 **36**, 486-490 (1992).
- 3) Lancini, G. and Parenti, F.: *Antibiotics*. Springer-Verlag, New York. p. 82-83 (1982).
- 4) Shaw, W. V.: Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. Crit. Rev. Biochem. **14**, 1-46 (1983).
- 5) Sands, L. C. and Shaw, W. V.: Mechanism of chloramphenicol resistance in staphylococci: characterization and hybridization of variants of chloramphenicol acetyltransferase. Antimicrob. Agents Chemother. **3**, 299-305 (1973).
- 6) Shaw, W. V.: Bacterial resistance to chloramphenicol. Br. Med. Bull. **40**, 36-41 (1984).
- 7) Brenner, D. G. and Shaw, W. V.: The use of synthetic oligonucleotides with universal templates for rapid DNA sequencing: results with staphylococcal replicon pC221. EMBO J. **4**, 561-568 (1985).
- 8) Projan, S. J., Kornblum, J., Mcghazeh, S. L., Edelman, I., Gennaro, M. L. and Novick, R. P.: Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, cognate plasmid replicons from *Staphylococcus aureus*. Mol. Gen. Genet. **199**, 452-464 (1985).
- 9) Brueckner, R. and Matzura, H.: Expression of a chloramphenicol-resistance determinant carried on hybrid plasmids in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gene **32**, 151-160 (1984).
- 10) Lyon, B. R., May, J. W. and Skurray, R. A.: Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple-antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **23**, 817-826 (1983).
- 11) Novick, R. P.: Plasmid-protein relaxation complexes in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **127**, 1177-1187 (1976).
- 12) Wilson, C. R., Skinner, S. E. and Shaw, W. V.: Analysis of two chloramphenicol resistance plasmids from *Staphylococcus aureus*: insertional inactivation of Cm resistance, mapping of restriction sites, and construction of cloning vehicles. Plasmid **5**, 245-258 (1981).
- 13) Horinouchi, S. and Weisblum, B.: Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. **150**, 815-825 (1982).
- 14) Gillespie, M. T. and Skurray, R. A.: Structural relationships among chloramphenicol-resistance plasmids of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Letters **51**, 205-210 (1988).
- 15) Schwarz, S. and Cardoso, M.: Nucleotide sequence and phylogeny of a chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **35**, 1551-1556 (1991).