

## 임상분리 *Staphylococcus*속 균주로부터 마크로라이드-린코사마이드-스트렙토그라민 B(MLS)계 항생물질에 대한 새로운 유도내성 유전자의 검색

오정자 · 권애란 · 이미정 · 김숙경 · 최성숙 · 최응칠\* · 김병각  
서울대학교 약학대학

## Screening of Novel Inducible Resistance Gene to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLS) Antibiotics from Clinical Isolates of *Staphylococcus* spp.

Jung-Ja OH, Ae-Ran KWON, Mi-Jung LEE, Sook-Kyung KIM,  
Sung-Sook CHOI, Eung-Chil CHOI\* and Byong-Kak KIM

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received June 22, 1993; accepted August 14, 1993)

**Abstract**—From 84 clinical isolates of *Staphylococcus* species, ten strains showing inducible resistance to MLS antibiotics were selected by disk agar diffusion method. Colony hybridization was executed using two MLS inducible resistance genes, *ermA* and *ermC*, previously identified from *S. aureus* as probes. *S. hemolyticus* 401 and *S. epidermidis* 542 whose genes were not homologous to those probes were finally selected. It was determined that the resistance genes of *S. hemolyticus* 401 and *S. epidermidis* 542 were not homologous to *ermA*, *ermC* and *ermAM* by Southern hybridization. *S. epidermidis* 542 had a plasmid DNA. To know if the plasmid may have genes related to inducible resistance, it was attempted to transform *B. subtilis* BR151 and *S. aureus* RN4220 with the plasmid prepared from *S. epidermidis* 542. It was shown that the gene related to inducible resistance to MLS antibiotics did not exist in this plasmid. These results indicate that two clinical isolates of *S. hemolyticus* 401 and *S. epidermidis* 542 had novel genes which were not homologous to MLS resistance genes identified previously. It was assumed that these genes may exist in chromosomal DNA.

**Keywords** □ clinical isolates, MLS antibiotics, inducible resistance, colony hybridization, Southern hybridization, *S. hemolyticus* 401, *S. epidermidis* 542, transformation.

Macrolide-lincosamide-streptogramin B(MLS) 계열 항생물질은 세균의 50S ribosomal subunit에 작용하여 단백질 생합성을 억제함으로써 항균작용을 나타내는 macrolide계, lincosamide계 및 streptogramin B계 항생물질의 총칭이다. 이들은 중범위 항생물질로서 Gram 양성 구, 간균 및 Gram 음성 구균에 작용하는 것으로 알려져 있으며 그 밖에도 *Campylobacter*, *Legionella*, *Chlamydia* 등의 균주들에게도 효과가 있음이 보고된 바 있다(Pestka 등, 1977).

Erythromycin(EM)이 치료에 도입된지 몇년 후인 1956

년, *Staphylococci*에서 이 항생제에 대한 내성이 출현하게 되었고 그 후 여러 지역으로 내성이 퍼져 나가게 되었다(Chabbert 등, 1956). 지금까지 확인된 내성 균주들로부터 내성기전을 추정해 본 결과 돌연변이에 의해 ribosome의 구성 단백질인 L4, L22(*E. coli*) 또는 L17(*B. subtilis*)의 변화에 의한 것(Wittman 등, 1973; Tipper 등, 1977)과 23S rRNA의 구조변화에 의해 이들 항생제의 결합력이 상실된 경우로 나눌 수 있으며 후자의 경우 돌연변이에 의한 염기치환(Sigmund 등, 1982) 또는 특정위치(A2058)의 methylation에 의한 경우가 있다. 이 내성이 EM의 target site인 50S ribosomal subunit내의 23S rRNA의 변화에 기인하는 경우, 구조는 다르지만

\* To whom correspondence should be addressed.

동일한 target site를 가지는 MLS계 항생물질에 대하여 교차내성이 나타난다(Lai 등, 1973). MLS 내성 균주의 대부분이 23S rRNA의 N<sup>6</sup>-monomethylation 또는 N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimethylation에 기인한 것으로 보고되어 있으며 methylation되는 위치 또한 *E. coli* 및 *Bacillus*의 ribosome에서 conserved되어 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 50S ribosomal subunit 내에 methylase 및 MLS 항생제가 결합하는 위치는 같지 않으며 단지 methylation에 의한 ribosome의 conformation 변화로 EM이 결합하지 못하는 것으로 알려져 있다(Dubnau 등, 1984).

지금까지 밝혀진 MLS 내성유전자의 내성 조절 기전은 크게 translational(또는 transcriptional) attenuation, mRNA stability, translational feedback inhibition 및 autoregulation의 4가지로 나뉘어진다. 이들은 서로 독립적으로 작용함으로써 전체적인 유전자 발현을 조절한다.

*ermC*는 *S. aureus*에서 분리된 pE194 plasmid에 존재하는 MLS 내성 유전자로서 methylase에 대한 구조유전자외에 14개의 아미노산으로 구성된 leader peptide를 coding하는 유전자가 구조유전자 앞부분에 존재하며 translational attenuation 기전에 의해 조절된다. 이러한 translational attenuation 기전에 의한 조절은 *ermC* 뿐 아니라 *ermA*, *G*, *SF*, *AM* 등 지금까지 밝혀진 대부분의 유도 내성 인자들에 존재하는 것으로 증명된 바 있다(Monod 등, 1987).

MLS 내성 유전자의 발현 조절 기전을 보다 명백하게 규명하기 위해서는 지금까지 밝혀진 유전자들과는 별도로 유도 내성을 나타내는 다양한 종의 균주들로부터 내성 유전자를 cloning하고 염기배열을 결정하여 이로부터 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해석하는 것이 필요하다. 이를 지금까지 밝혀진 다른 MLS 내성 유전자의 발현 기전과 비교 검토함으로써 MLS 내성 유전자의 발현 조절 기전을 보다 자세히 설명할 수 있을 뿐 아니라 지금까지 알려지지 않은 또 다른 유전자 발현 기전의 발견 가능성도 기대할 수 있다.

본 연구에서는 MLS계 항생물질에 대한 새로운 유도내성 유전자를 검색하기 위해 임상에서 분리한 *S. aureus*와 coagulase-negative *Staphylococci* 균주로부터 EM 내성균을 선발하였다. 이 중 고체 배지 디스크법을 이용하여 MLS계 항생물질에 대한 유도내성균을 선발하고, 기존의 *Staphylococcus*속과 *Streptococcus*속 균주에서 밝혀진 MLS 유도내성 유전자인 *ermA*, *ermC* 및 *ermAM*를 probe로 한 colony hybridization을 통해 이들 유전자에 대해 동질성이 없는 균주를 선발하였다. Plasmid DNA를 가진 균주에 대해서는 plasmid DNA상에 유도내성 유전자가 존재하는지를 확인하기 위해 *B. subtilis* BR151과 *S. aureus* RN4220을 형질전환시켰다.

## 실험방법

### 균주 및 plasmids

임상에서 분리한 70종의 *Staphylococcus aureus*와 14종 coagulase negative *Staphylococci*를 대상으로 검색하였으며 형질전환을 위한 host로서 *B. subtilis* BR151와 *S. aureus* RN4220을 사용하였다. 그리고, pLS200, pE194 및 pAM77을 이용하여 DNA probe를 제조하였다.

### 효소 및 방사성 등위원소

Erythromycin(EM), kitasamycin(KIT), tylosin(TYL) 등의 항생물질 및 Trizma base, EDTA, SDS, sucrose, Denhardt's solution 등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, formamide은 Aldrich 제품을, 전기영동 시약 및 cesium chloride 등은 Bethesda Research Labs(BRL)사의 ultra pure 제품을 사용하였다. 방사성 등위 원소인 [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP(>1000 Ci/mmol)는 New England Nuclear (NEN) 제품을 사용하였다. 각종 제한효소는 New England Biolabs(NEB), KOSCO, Boehringer Mannheim사로부터, DNase I, DNA polymerase I는 KOSCO사로부터 구입하였고 Lysozyme, Lysostaphin, RNase 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

### EM에 대한 내성균의 선발

EM이 10  $\mu$ g/ml의 농도로 함유되어 있는 MH 고체평판 배지에 임상분리균 액내 배양액을 접종하여 균의 성장 여부를 관찰하였다.

### 고체배지 디스크법에 의한 MLS 유도내성균의 선발

3 ml의 top agar 배지에 EM 내성균의 액내배양액 100  $\mu$ l를 가한 후 항생물질이 함유되지 않은 MH 고체평판 배지에 분주하였다. EM, KIT, TYL 등의 항생물질이 20  $\mu$ g/disk 농도로 함유된 디스크를 배지위에 놓고 디스크 주위의 균의 성장 형태를 관찰하였다.

### Colony Hybridization(Benton 등, 1977)

MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 나타내는 균주에 대해 *ermA* 및 *ermC* 유전자와 동질성(homology)이 있는지를 확인하기 위하여 colony hybridization을 실시하였다. *ermA*의 EcoRI-EcoRI 절편과 *ermC*의 TaqI-TaqI 절편을 nick translation하여 DNA probe를 만들었다.

### 임상 분리 균주로부터 plasmid의 분리

*Staphylococcus*속의 plasmid는 lysozyme에 의한 방법으로는 cell wall이 잘 파괴되지 않거나 분리된 plasmid의 양이 아주 적으므로 lysis broth를 이용한 변형된 Elliker법을 응용하여 plasmid를 분리하였다(Elliker 등, 1981).

### Total DNA의 분리

*S. hemolyticus* 401과 *S. epidermidis* 542 균주를 각각 100  $\mu$ l의 LB배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후 원심분리하여 균체를 수확하였다. 여기에 3 ml의 TES buffer를 가하여 잘 현탁한 다음 lysozyme(5 mg/ml)과 lysostaphin(5 mg/ml)을 0.3 ml씩 가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 0.6 ml의 10% SDS 용액과 1.05 ml의 5 M sodium perchlorate 용액을 가하여 잘 섞은 다음 동량의 chloroform으로 여러번 추출한 후 무수 ethanol을 가하여

침전된 DNA를 glass rod를 사용하여 회수하였다. 생성된 DNA를 다시 glass 끝에 취한 후 DNA를 1 ml의 TE buffer에 녹였다. 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA양을 정량하였다.

#### Southern Hybridization(Southern, 1975)

*S. hemolyticus* 401와 *S. epidermidis* 542에 존재하는 MLS 내성 유전자가 이미 *S. aureus*에서 밝혀진 MLS 내성 유전자인 *ermA*, *ermC*와 더불어 *S. sanguis*에서 분리된 내성 유전자인 *ermAM*과 동질성이 있는가를 알아보기 위해 Southern hybridization을 실시하였다. Plasmid는 자연형태로 total DNA를 *Sau3AI*으로 부분 절단한 다음 1% agarose gel에 loading하여 전기영동을 실시하였다. 옮길 gel을 1.5 M NaCl-0.5 N NaOH 용액에 상온에서 1시간 정도 흔들여 주면서 DNA를 불활성화시켰다. Gel을 다시 충분한 양의 1 M Tris.Cl(pH 8.0)+1.5 M NaCl 용액에 담근 후 흔들여 주면서 1시간 정도 반응시켜 DNA를 중화시켰다. Gel을 acryl plate에 뒤집어 놓고 NC filter와 3MM paper 2장을 올려 놓은 후 paper towel을 적당한 무게로 하룻밤 눌러 놓아 DNA가 NC filter에 transfer되도록 하였다. NC filter를 plastic bag에 넣고 prehybridization 용액(6×SSC, 0.5% SDS, 5× Denhart's solution, 100 µg/ml denatured Salmon sperm DNA) 약 5 ml를 가해 고무 적신 후, 5분간 끓여 denaturation 시킨 hybridization probe(1×10<sup>7</sup> cpm/µg)를 가하고 bag을 sealing하여 42°C에서 하룻밤 shaking하였다. 다음 날 filter를 꺼내어 250 ml의 2×SSC+0.1% SDS 용액으로 상온에서 10분씩 4회 세척하고, 500 ml의 0.1×SSC+0.1% SDS 용액으로 52°C에서 10분씩 2회 세척하였다. NC filter를 상온 건조시킨 후 X-ray film에 이를 동안 직접 노출시켜 autoradiograph를 얻었다.

#### *Bacillus subtilis* BR151의 형질 전환

유도내성과 관련된 유전자가 plasmid상에 존재하는지를 확인하기 위하여 *S. epidermidis* 542 균주로부터 분리된 plasmid로 형질전환시켰다. *B. subtilis* BR151 균주를 staph medium에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 삼각 플라스크에 SPMM I용액 13.5 ml과 1.5 ml의 배양 균액을 넣고 37°C에서 300 rpm의 속도로 3.5 시간 배양하였다. 새 플라스크에 36 ml의 SPMM II용액과 위의 배양 균액 4 ml를 넣고 다시 37°C에서 250 rpm의 속도로 1.5시간 배양하였다. 5분간 원심분리하여 얻은 competent cell을 4 ml의 SPMM II로 현탁시켰다. 0.5 ml의 competent cell 현탁액과 0.5 ml의 SPMM II를 플라스크에 넣고 plasmid DNA 용액 10 µl를 가한 후 37°C에서 300 rpm의 속도로 40분간 진탕배양하였다. Erythromycin이 0.05 µg/ml의 농도로 함유된 LB 배지 2 ml를 첨가한 후 37°C에서 60분간 정지 배양하였다. 원심분리하여 균체를 얻고 EM이 10 µg/ml의 농도로 함유된 LB agar plate에 도말하였다. 37°C에서 이틀간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다.

#### Protoplast법에 의한 *S. aureus* RN4220의 형질전환 (Chang 등, 1979)

*S. aureus* RN4220을 10 ml의 LB배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 다음 원심분리하여 얻은 pellet을 10 ml의 HBM에 현탁시켰다. 이 현탁액에 lysozyme(4 mg/ml)과 lysostaphin(100 µg/ml)이 함유된 HBM 10 ml를 가하고 37°C에서 2~3시간 방치하였다. 이 반응액을 원심분리(15분, 7,000 rpm)하여 cell debris를 제거하고, 상등액을 다시 원심분리(15분, 19,000 rpm)하여 protoplast pellet을 얻었다. 2 ml의 HBM으로 protoplast pellet을 현탁시키고, 이 중 200 µl의 현탁액에 20 µl의 2×HB, 1 µg의 plasmid DNA, 1.8 ml의 40% PEG 6,000을 가하여 상온에서 2분 동안 방치하였다. 10 ml의 HBM을 가하여 PEG 용액을 희석시키고 원심분리(30분, 4°C, 19,000 rpm)하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 0.4 ml의 HBM에 현탁시키고 100 µl씩 DM3 재생배지에 도말하여 37°C에서 전배양하였다. EM(10 µg/ml)을 함유하는 HB/TSB[2×TSA(Tryptic soy broth agar)와 2×HB를 동량 섞은 배지] 5 ml를 전배양한 배지위에 부어 굳히고 37°C에서 2~4일간 배양하였다.

#### 실험결과

##### 임상분리균주의 MLS계 항생물질에 대한 내성

EM에 대한 내성균주의 출현빈도는 총 84종의 균주 중 34주(40%)로서 *S. aureus* 70주 중에서 26주(37%), coagulase negative *Staphylococci* 14주 중에서 8주(57%)가 내성균주였다. MLS계 항생물질에 대한 내성 표현형은 34종의 내성균주 중에서 10주(30%)가 유도내성을 보였고 24주(70%)가 본태성내성을 보였다(Table I).

##### 유도내성 표현형을 갖는 균주의 colony hybridization

MLS계 항생물질에 대해 유도내성 표현형을 갖는 10주에 대해 *ermA*, *ermC*를 <sup>35</sup>S-dATP로 표지하여 colony hybridization을 실시하였다. 결과 8종의 균주들은 *ermA* 및 *ermC* 유전자에 대해 동질성을 보였으며, 두 probe에 대해 동질성이 없는 *S. hemolyticus* 401과 *S. epidermidis* 542를 선발하였다(Fig. 1).

##### Plasmid의 존재 확인

Table I. MLS phenotypes of clinical isolates of *Staphylococcus* spp

Strains	Susceptible	MLS Resistance	
		Inducible	Constitutive
<i>S. aureus</i> (70)	44 (63%)	26 (37%)	7
Coagulase-negative <i>Staphylococci</i> (14)	6 (43%)	8 (57%)	19
Total (84 : 100%)	50 (60%)	34 (40%)	3

Lysis broth를 이용한 방법으로 *S. epidermidis* 542 균주에 plasmid가 존재함을 확인하였다(Fig. 2).

#### Southern Hybridization

*S. hemolyticus* 401과 *S. epidermidis* 542 균주로부터 분리한 DNA에 대하여 total DNA는 Sau3AI으로 partial digestion하였으며 plasmid는 자연형태를 이용하였다. *ermA*와 *ermC*를 probe로 한 Southern hybridization을 통해 동질성이 없음을 확인하였고(Fig. 2), *Streptococcus sanguis*에서 밝혀진 *ermAM* 유전자 부분(pAM77을 *DdeI*으로 절단한 1.2 kb의 절편)을 probe로 하여 이 유

전자와도 동질성이 없음을 확인하였다(Fig. 3).

#### *B. subtilis* BR151의 형질전환

*B. subtilis* BR151을 competent cell로 만든 다음 *S. epidermidis* 542에서 분리한 plasmid로 형질전환시킨 결과 EM에 내성인 형질전환체를 얻을 수 없었다.

#### *S. aureus* RN4220의 형질전환

*S. aureus* RN4220을 protoplast로 만들어 *S. epidermidis* 542에서 분리한 plasmid를 형질전환시켰으나 EM에 내성인 형질전환체는 생성되지 않았다.

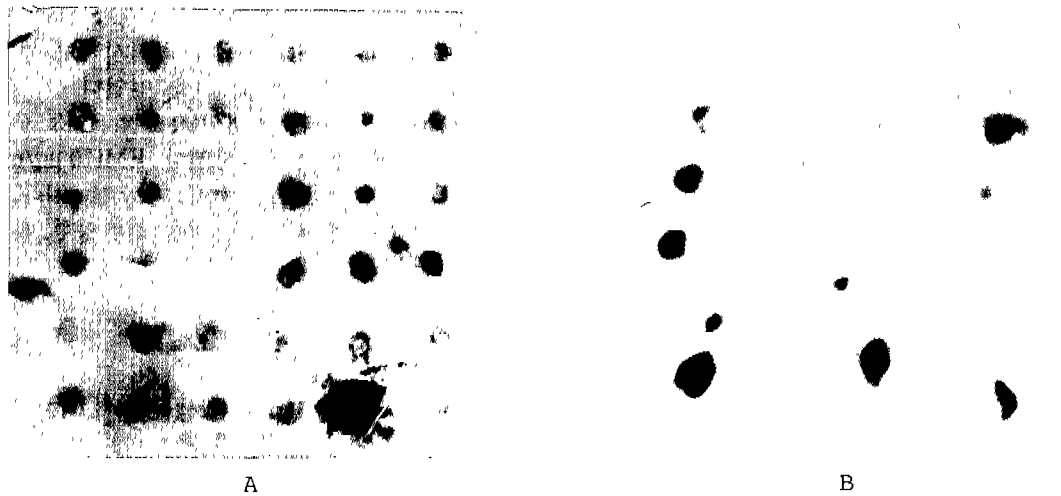


Fig. 1. Colony hybridization of Staphylococci with MLS inducible phenotype. (A) Autoradiograph probed by  $^{35}\text{S}$ -labelled *ermA*. (B) Autoradiograph probed by  $^{35}\text{S}$ -labelled *ermC*.

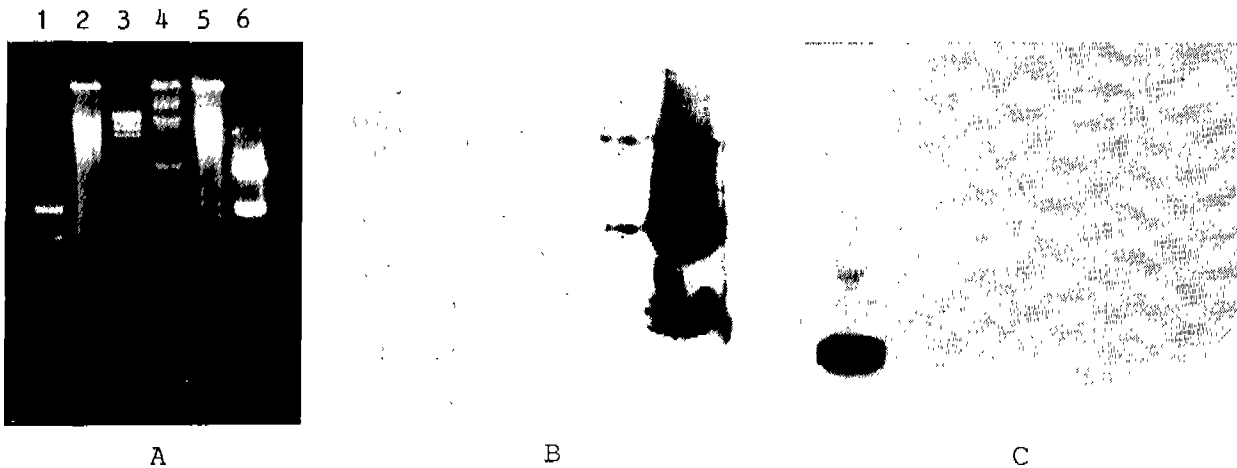


Fig. 2. Southern hybridization of DNA prepared from *S. hemolyticus* 401 and *S. epidermidis* 542 probed by *ermA* and *ermC*. (A) 1% agarose gel electrophoresis pattern. lane 1: pE194 digested with *Taq* I (positive control), lane 2: *S. hemolyticus* 401 total DNA partially digested with *Sau*3A I, lane 3: lambda DNA digested with *Hind* III (size marker), lane 4: plasmid of *S. epidermidis* 542, lane 5: *S. epidermidis* 542 total DNA partially digested with *Sau*3A I, lane 6: pLS200 digested with *Eco*R I (positive control) (B) Autoradiograph of Southern hybridization probed by *ermA*. (C) Autoradiograph of Southern hybridization probed by *ermC*.

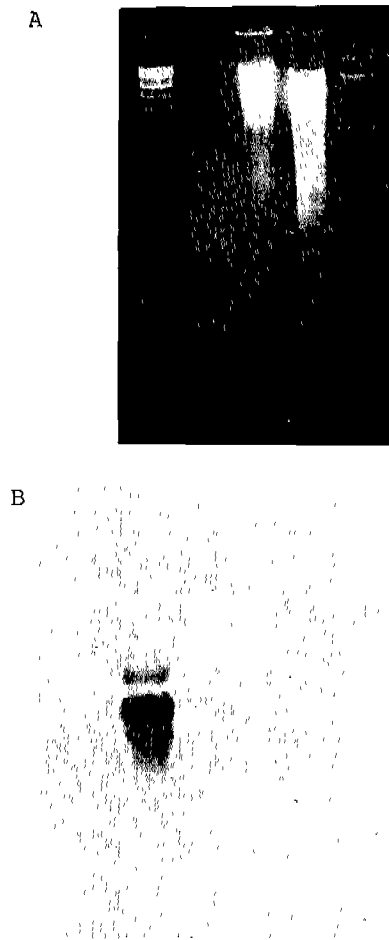


Fig. 3. Southern hybridization of DNA prepared from *S. hemolyticus* 401 and *S. epidermidis* 542 probed by  $^{35}\text{S}$ -labelled *ermAM*.

(A) 1% agarose gel electrophoresis pattern.

lane 1: *Hind* III digested lambda DNA (size marker), lane 2: pAM77 digested with *Dde* I (positive control), lane 3: *S. hemolyticus* 401 total DNA partially digested with *Sau*3A I, lane 4: *S. epidermidis* 542 total DNA partially digested with *Sau*3A I, lane 5: plasmid of *S. epidermidis* 542.

(B) Autoradiograph.

## 고 찰

MLS계 항생물질에 대해 내성을 갖는 세균들 중에는 본태적으로 항상 내성을 나타내는 균주와 EM등의 inducer에 접촉되었을 때 내성이 유도되는 유도내성균주가 있다. 이 중 분자생물학적 견지에서 더욱 큰 의의가 있는 유도내성기전에 대해 연구하기 위하여 임상에서 분리한 *Staphylococcus*속 균주로부터 EM 내성균을 선발하고 고체배지 디스크법에 의해 MLS계 항생물질에 대한 유도내성을 갖는 균주를 선발하였다.

EM에 대한 내성균주의 출현빈도는 약 40%로서 1986년의 20%, 1987년의 38%(Koo 등, 1987)에 비해 증가되었다. 특히, coagulase negative *Staphylococci*에서는 57%

의 높은 내성을 보였다. EM내성 균주들 중에서 MLS계 항생물질에 대한 유도내성 표현형을 갖는 균주는 10주(30%)였으며 이 균주에 대해서는 기존의 *Staphylococcus*속 균주에서 밝혀진 유도내성 유전자인 *ermA* 및 *ermC*와 동질성을 비교하기 위해 colony hybridization을 실시한 결과 5주가 *ermA* 유전자와, 3주가 *ermC* 유전자와 동질성이 있었으며 이 중 2주는 *ermA*, *ermC* 모두에 동질성을 보였다. *S. hemolyticus* 401과 *S. epidermidis* 542 균주는 두 유전자와 동질성을 보이지 않았으며, 이는 MLS계 항생물질에 대한 새로운 유도내성 유전자를 가질것으로 기대되어 더욱 연구를 진행하였다. 위 균주에서 plasmid DNA와 total DNA를 분리하였으며 이를 이용하여 Southern hybridization을 실시한 결과 *ermA*, *ermC* 유전자와는 동질성이 없음이 확실시되었다. 또 여기에 결과는 나타내지 않았지만, *Streptococcus sanguis*에서 밝혀진 *ermAM*을 probe로 하여 Southern hybridization을 실시하여 이 유전자와도 동질성이 없음을 확인하였다.

유도내성에 관한 유전자 정보가 chromosomal DNA에 있는지 plasmid DNA상에 있는지를 확인하기 위해 *S. epidermidis* 542에서 분리된 plasmid로 *B. subtilis* BR151을 형질전환시킨 결과 형질전환체가 생성되지 않았다. *Staphylococcus*에서 유래한 plasmid가 *Bacillus*를 숙주로 하였을 때 발현되지 못할 가능성이 있기 때문에 같은 속의 *S. aureus* RN4220의 형질전환을 시도하였다. 그 결과 EM에 내성인 형질전환체는 형성되지 않았으며 tetracycline(TC)에 대해 내성인 형질전환체를 얻을 수 있었다. 그러므로 이 plasmid에는 TC 내성 유전자가 존재함이 확인되었다. 이로써 plasmid상에는 MLS계 항생물질에 대한 유도내성 유전자가 존재하지 않고 chromosomal DNA상에 내성 유전자가 존재하는 것으로 추정되었다.

*S. hemolyticus* 401과 *S. epidermidis* 542 균주는 기존의 *Staphylococcus*속에서 밝혀진 유전자와는 다른 유전자를 지니며 새로운 유전자 발현조절에 관한 정보를 가질것으로 기대된다.

앞으로의 계속적인 실험을 통하여 chromosomal DNA로부터 methyltransferase 유전자를 cloning하고, 이 유전자의 DNA sequence를 밝히며 이로 인해 예상되는 mRNA의 2차구조와 나아가서는 23S rRNA의 변화 및 유전자 산물에 대한 연구가 계속되어야 하리라 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구센터(한국과학재단)의 지원과 92년도 보건사회부의 신약 개발 지원 연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사합니다.

## 참고문헌

- Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977). Screening  $\lambda$ gt recombinant colonies by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Chang, S. and Cohen, S.N. (1979). High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111-115.
- Chabbert, Y.A. (1956). Antagonisme in vitro entre l'erythromycine et la spiramycine. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **90**, 780-791.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1980). Post-transcriptional modification of RNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**, 7070-7083.
- Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982). Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**, 800-814.
- Horinouchi, S., Byeon, W.H. and Weisblum, B. (1983). A complex attenuator regulates inducible resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin type B antibiotics in *Streptococcus sanguis*. *J. Bacteriol.* **154**, 1250-1262.
- Koo, E.C. and Kim, S.I. (1987). Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from blood in the last 3 years. *J. Korean Soc. Chemother.* **5**, 19-25.
- Monod, M., Mohan, S. and Dubnau, D. (1987). Cloning and analysis of ermG, a new macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **169**, 340-350.
- Murphy, E. (1985). Nucleotide sequence of ermA, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **162**, 630-640.
- Pestka, S. (1977). Inhibitors of protein synthesis. In *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis* (H. Weissbach, and S. Pestka, Eds.), pp. 468-553. Academic Press, New York.
- Rigby, P.W., Dieckmann, J., Rhodes, C. and Berg, C. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 230-241.
- Sigmund, C.D. and Morgan, E.A. (1982). Erythromycin resistance due to a mutation in a ribosomal RNA operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5600-5607.
- Tipper, D.J., Johnson, C.W., Ginther, C.L., Leighton, T. and Wittmann, H.G. (1977) Erythromycin resistant mutations in *Bacillus subtilis* cause temperature sensitive sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **150**, 140-153.
- Wittmann, H.G., Stoffler, G., Apirion, D., Rosen, L., Tanaka, K., Tamaki, M., Takata, R., Dekio, S., Otaka, E. and Osawa, S. (1973). Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins. *Mol. Gen. Genet.* **127**, 170-181.