

주암호에서 Aminoglycoside Acetyltransferases와 Aerolysin 유전자의 분자생물학적 검출

이영종^{1,2} · 한호심¹ · 정재성^{1*}

¹순천대학교 생물학과, ²광주보건대학 임상병리학과

1996년 1월부터 1998년 12월까지 주암호의 한 정점에서 12개의 시료를 채수하여 총 세균의 DNA를 추출한 뒤 DNA 중에 gentamicin 저항성에 관련된 aminoglycoside acetyltransferase들의 유전자인 *aacC*들 (*aacC1*~*aacC4*)과 *Aeromonas* 속이 생산하는 독소인 aerolysin 유전자의 존재 여부를 PCR을 통해 확인하였다. 전체 12개의 DNA 시료 중 9개의 시료에서 *aacC2* 유전자가 검출되었고, *aacC2* 유전자가 검출된 시료 중 7개의 시료에서 *aacC2* 유전자가 Tn3의 염기서열과 연관되어 발현이 증가되는 구조를 하고 있었다. 그러나 *aacC1*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자는 검출되지 않았다. *Aeromonas* 속에서 보고된 aerolysin과 hemolysin 등의 유전자에서 conserved region을 찾아내어 aerolysin 유전자의 검출을 위한 PCR primer set를 설계하였다. 설계된 primer set는 12개의 DNA 시료 중 7개의 시료에서 예상된 414 bp의 PCR 산물을 증폭하였다. 이 DNA 절편을 probe로 사용하여 Southern hybridization을 행한 결과 12개의 DNA 시료 중 10개의 시료에서 aerolysin 유전자가 검출되었다. 그러나 이들 유전자의 계절에 따른 출현의 변화는 발견되지 않았다.

Key words □ aerolysin, *Aeromonas* aminoglycoside acetyltransferase, PCR, Tn3

채취된 시료로부터 미생물을 분리하고 순수 배양하는 것은 자연 환경에서 미생물 군집의 다양성을 분석하기 위해 전통적으로 사용되고 있는 방법 중 하나이다. 그러나 자연에서 발생하는 다양한 미생물 군집들 중 극히 일부만이 순수 배양되는 것으로 알려져 있다(19,24). 전통적인 방법의 이러한 문제는 PCR(21,23), DNA hybridization(5) 등과 같은 분자생물학적 방법의 발달로 극복할 수 있게 되었다. 이러한 분자생물학적 방법은 미생물을 순수 배양하지 않고 환경시료에 존재하는 세포로부터 DNA를 추출하여 특정한 유전자를 검출함으로써 다양한 미생물 군집의 특성을 파악할 수 있게 하였다.

Gentamicin, kanamycin 등과 같은 aminoglycoside계 항생물질은 여러 가지 세균성 감염을 치료하기 위해 광범위하게 사용되고 있다. 이로 인해 항생제에 대한 높은 저항성을 가지는 세균이 증가하게 되고 하수, 하천 등 수계 환경으로 유입되어 수질을 악화시킬 수 있는 하나의 인자로 작용할 수 있다. 그러므로 수계 환경에서 항생제 저항성 유전자의 발생은 수질 오염과 밀접하게 연관되어 있으며 이러한 유전자의 발생빈도는 오염 지표의 하나로 이용될 수 있을 것이다. 저자 등은 전보(13)에서, 수계 환경에서 aminoglycoside acetyltransferases의 유전자인 *aacC1*, *aacC2*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자의 분포를 분석하였다. 또한 Tn3 염기서열이 *aacC2* 유전자와 연관되어 있을 경우 이 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인 한 바 있다(3,9,10).

한편 *Aeromonas* 속은 Vibrionaceae 과에 속한 그램 음성인 혐

기성 세균으로 음용수, 강 하구, 하수 등 많은 수계 환경에서 발견된다(4,14,15). 광범위한 수계 환경에서 발견되는 이들 세균들은 사람과 동물에 기회감염을 유발하는 것으로 알려져 있어 주의가 요망되고 있다(8). *Aeromonas* 속의 세균들은 hemolysins, cytotoxins, enterotoxins 및 aerolysins 등의 이름으로 불려지는 생물학적으로 활성이 있는 물질을 생산하여 세포 외로 분비한다. 이러한 독성 인자 중 가장 많이 알려져 있는 것은 *A. hydrophila*에 의해 생산되는 aerolysin으로, 감염되었을 때 질병의 주원인이 되고 있다. *Aeromonas* 속의 세균을 검출하기 위해서는 일반적으로 특수하게 고안된 배지를 사용하여 배양하여야 한다. 그러나 배양 방법은 시간이 많이 소요되므로 이러한 단점을 보완하기 위하여 제안되는 방법이 PCR이다. PCR assay는 높은 특이성과 민감성을 가지고 신속하게 환경에서 특정미생물을 검출할 수 있기 때문이다.

본 실험은 주암호에서 채수한 시료로부터 *aacC* 유전자의 분포와 Tn3의 염기서열과의 연관성을 분석하여 호수내 세균에서 항생물질 저항성 유전자를 살펴보고, aerolysin과 같은 독성 인자를 생산하는 *Aeromonas* 속의 존재 여부를 검출하는데 사용할 primers를 설계, 적용하여 PCR assay와 DNA hybridization과 같은 분자생물학적 방법이 수계환경에서 미생물 군집을 감지할 수 있는 민감한 방법으로 이용될 수 있는지를 검토하였다.

재료 및 방법

재료 채취

본 조사는 수계환경에 들어 있는 특정 유전자의 존재를 확인

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 0661-750-3616, Fax: 0661-750-3608
E-mail: jjung@sunchon.sunchon.ac.kr

하기 위해 1996년 1월부터 1998년 12월까지 주암호의 동일한 장소에서 표면수 1 l 씩을 총 12회 채수하였다.

DNA 추출

채수한 1 l의 시료를 16,000×g에서 30분간 원심분리한 후 침전물을 모아 1 ml의 TE에 현탁시켰다. 이 후의 DNA 추출과정은 전보에서 보고한 방법(12)을 따랐다.

DNA 정량

추출된 DNA의 농도는 Hoechst 33258 dye를 사용하여 TKO100 fluorometer (Hoefler Scientific Instruments)로 정량하였다.

Aminoglycoside acetyltransferase 유전자 검출을 위한 oligonucleotide primers

Aminoglycoside acetyltransferase 유전자를 검출하기 위하여 *aacC1*(18), *aacC2*(20), *aacC3*(22) 및 *aacC4*(1) 유전자의 염기서열을 기초로 20-mer의 oligonucleotide primers를 제조하여 사용하였다. 제조된 primer들의 염기서열은 다음과 같다. *aacC1*-1: 5'-ATA ACC TAC TCC CAA CAT CC-3'과 *aacC1*-2: 5'-ATA TAG ATC TCA CTA CGC GC-3'; *aacC2*-1: 5'-ACT GTG ATG GGA TAC GCG TC-3'과 *aacC2*-2: 5'-CTC CGT CAG CGT TTC AGC TA-3'; *aacC3*-1: 5'-CAC AAG AAC GTG GTC CGC-3'과 *aacC3*-2: 5'-AAC AGG TAA GCA TCC GCA TC-3'; *aacC4*-1: 5'-CTT CAG GAT GGC AAG TTG GT-3'과 *aacC4*-2: 5'-TCA TCT CGT TCT CCG CTC AT-3'. 이 primer들은 각각 169 bp, 237 bp, 185 bp, 및 250 bp의 DNA 절편을 증폭한다

(13). 또한 Tn3에 의해 발현이 증가되는 유전자 구조의 존재여부를 알기 위해 Tn3 염기서열과 *aacC2* 유전자 사이를 증폭할 수 있는 primer로 GenF: 5'-TTT TCG TTC CAC TGA GCG-3'과 GenR: 5'-CGC CAT TCA GAG TCT CCT-3'(10)을 사용하였다.

Aerolysin과 hemolysin 유전자 검출을 위한 primer의 설계

Aerolysin 유전자 검출을 위한 primer를 설계하기 위하여 GenBank에 등록되어 있는 aerolysin과 hemolysin 유전자의 염기서열을 비교하였다. *A. hydrophila*에서 보고된 5 종류, *A. sobriia*에서 1 종류, 그리고 *A. salmonicida*에서 1 종류, 총 7 개 독소 유전자의 염기서열을 비교하여 적당한 conserved region을 찾아 primer set를 설계하였다(Fig. 1). 설계된 primer의 염기서열은 *aero355*: 5'-TGA CCA CCA AGA ACA AGT T-3'과 *aero356*: 5'-TCC CAC CAC TTC ACT TCA C-3'이다. 이 primer set는 aerolysin 유전자로부터 414 bp의 DNA 단편을 증폭한다.

PCR assay

Aminoglycoside acetyltransferases의 유전자인 *aacC1*, *aacC2*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자를 검출하기 위해 PCR을 실행하였다. PCR 반응액은 1 μl의 DNA(20 ng), 2 U의 *Taq* DNA polymerase(Takara), 5 μl의 10× PCR buffer(100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8.3), 각각 1 μM의 primer, 200 μM의 deoxyribonucleotide triphosphates를 넣고 증류수로 최종 반응용액의 부피를 50 μl로 조절하였다. Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR System 2400을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 30회 반복



Fig. 1. Comparison of the genes encoding aerolysin and hemolysin from *Aeromonas* spp. for primer synthesis. The nucleotide sequences of *aero355* and *356* primer set are indicated by dark shaded boxes.

하였다. 마지막으로 72°C에서 4분간 반응시켰다(13). 증폭된 DNA 절편은 1.2%의 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. GenF와 GenR primer를 사용한 PCR도 위와 같은 조건으로 행하였으며, aerolysin 유전자를 검출하기 위한 PCR은 annealing 과정을 59°C에서 행하였다.

Southern hybridization

Probe는 대표균주 *A. hydrophila* Ah65의 DNA와 *aero355*, *aero356*을 이용하여 얻은 PCR산물을 이용하였다. PCR 산물을 agarose gel에서 전기영동한 다음 414 bp의 DNA band를 분리하여 GeneClean kit (Bio 101)로 정제하였다. 정제된 DNA는 digoxigenin (DIG)-11-dUTP (DIG High Prime DNA Labeling and Detection kit II, Boehringer Mannheim)와 함께 37°C에서 20 시간 반응시켜 probe로 제조하였다.

Aerolysin 유전자의 증폭된 DNA 절편을 nylon membrane으로 이적시킨 후 제조된 probe DNA와 DIG High Prime DNA Labeling and Detection kit II (Boehringer Mannheim)를 이용하여 Southern hybridization을 실행하였다. DNA가 이적되어 있는 nylon membrane을 probe DNA와 함께 68°C에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 membrane은 CSPD[®] ready-to-use 용액 (Boehringer Mannheim)으로 처리한 다음 X-ray film에 노출시켜 aerolysin 유전자의 증폭된 DNA 절편을 검출하였다.

결과 및 고찰

다량의 물속에 들어있는 미생물의 DNA를 효과적으로 분리하기 위해서는 먼저 시료를 농축하여야 한다. 그 방법으로는 ultrafiltration이 가장 효율적인 것으로 알려지고 있다(17). 그러나 채수된 시료에는 많은 양의 부유물 등이 포함되어 있어 여과를 방해하므로 다량의 물을 여과하는데 어려움이 있다. 또한 환경으로부터 분리한 DNA 시료에는 효소의 활성을 억제하는 물질들이 존재하기 때문에 PCR의 이용이 제한될 수 있다. 따라서 환경시료에서 분리한 DNA 시료는 PCR을 수행할 수 있는 최소한의 산출량과 순도를 유지해야 한다. 저자 등은 전보(12)에서 이러한 점들을 감안하여 수계환경 시료로부터 DNA를 가장 효율적으로 추출할 수 있는 방법이 효소처리와 함께 얼리고 녹이는 과정을 반복시킨 다음 phenol 추출을 한 경우임을 알았으므로 이 방법을 본 실험에 적용하였다. Table 1은 주암호에서 채수한 시료로부터 DNA를 추출하여 정량한 결과를 보여주고 있다. 추출된 DNA의 양은 시료 채취시기에 따라 시료 1 l 당 2.5 µg에서 350 ng까지 다양하게 나타났으나 12개의 시료 중 10개의 시료에서 1 µg 미만으로 나타났다.

항생물질 저항성 인자는 개체사이 또는 유전적으로 서로 연관성이 적은 종간에서도 plasmid를 통해 쉽게 전파되며, integrons 및 transposons과 같은 유전적 요소들에 의해 그 발현이 증가되거나 확산에 유리한 구조를 갖게된다(2). 또한 gentamicin 저항성 유전자인 *aacC2*는 도시하수가 유입되는 지점에서 증가하고, 가축의 사료에 첨가되는 tetracycline에 대한 저항성 유전자인 *tetQ*는 축산폐수가 유입되는 지점에서 높은 빈도로 출현하는 것으로 나

Table 1. DNA yield and heterotrophic bacterial numbers in twelve water samples collected from 1996 to 1998 in Juam lake

No. of water sample	Date of sampling (day/mo/yr)	DNA yield (µg/l)	CFU/ml*
1	31/1/96	0.85	3.0×10^1
2	7/4/96	0.95	1.42×10^3
3	7/9/96	2.5	ND
4	24/11/96	1.25	ND
5	27/12/96	0.5	3.0×10^1
6	27/4/97	0.7	1.57×10^2
7	27/7/97	0.6	2.43×10^2
8	27/10/97	0.5	7.50×10^2
9	24/1/98	0.35	7.80×10^1
10	29/4/98	0.55	1.43×10^4
11	29/7/98	0.5	3.04×10^4
12	29/11/98	0.4	ND

*Heterotrophic bacterial numbers were counted on plate count agar. ND: not determined

타하고 있다(11). 이러한 결과는 지표수나 하수가 항생물질 저항성 유전자의 pool 역할을 할 수 있다는 것을 의미하며, 수계환경에서 이러한 저항성 유전자의 존재여부는 그 유역의 주된 오염원의 유무를 나타내고 있다고 예측할 수 있다. 따라서 주암호에도 다양한 종류의 미생물 군집이 존재하고 있고, 이들 사이에서 항생물질 저항성 유전자의 확산이 다양한 방법에 의해 발생하고 있는 것으로 생각할 수 있다.

주암호의 채수 시료에서 추출한 DNA 시료 중 12개의 시료에서 aminoglycoside acetyltransferases의 유전자인 *aacC1*, *aacC2*, *aacC3* 및 *aacC4*를 PCR을 이용하여 검출하였다. 12개의 DNA 시료 중 9개의 시료에서 *aacC2* 유전자가 검출되었다(Fig. 2A). *aacC2* 유전자가 검출된 9개의 시료에 GenF, GenR primer set를 이용하여 PCR을 행한 결과 7개의 시료에서 *aacC2* 유전자와 Tn3의 염기서열이 연관되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 2B). Tn3의 염기서열은 *aacC2* 유전자의 상류부위에 존재하여 이 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다(3,8,9). *aacC2* 유전자가 검출된 대다수의 DNA 시료에서 Tn3의 염기서열이 존재한다는 것은 채수 지역의 미생물 군집이 강한 항생제 저항성을 가지며, 이러한 특성이 개체간, 종간으로 확산될 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 12개의 모든 DNA 시료에서 *aacC1*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자는 검출되지 않았다(자료 미제시). 저자 등이 전보(13)에서, 수계 환경에서 *aacC1*, *aacC2*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자의 분포를 분석하였을 때 하천에서 분리한 gentamicin 저항성 세균 중 약 5%의 세균이 *aacC2* 유전자를 가지고 있었으며, 특히 병원 하수에서 분리한 세균 중 높은 수준의 농도 (>2,000 µg/ml)에서 저항성을 보이는 세균의 87%가 이 유전자를 가지고 있음을 보고한 바 있다. 이러한 결과는 AAC(3)-I, AAC(3)-III, AAC(3)-IV보다 AAC(3)-II가 직접적으로 gentamicin에 대한 강한 저항성을 나타내게 하는 인자라는 것을 의미한다. 본 실험의 결

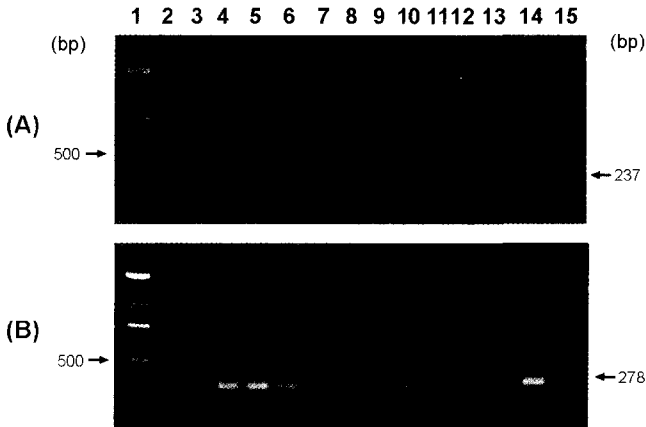


Fig. 2. PCR detection of *aacC2* gene in water samples from Juam lake. Amplification fragments were detected with *aacC2*-1 and *aacC2*-2 primer set by which a 237 bp product was amplified (A), and with GenF and GenR primer set by which a 278 bp was amplified (B). Lanes: 1, 100 bp-ladder marker; 2, Jan. 1996; 3, Apr. 1996; 4, Sep. 1996; 5, Nov. 1996; 6, Jan. 1997; 7, Apr. 1997; 8, Jul. 1997; 9, Oct. 1997; 10, Jan. 1998; 11, Apr. 1998; 12, Jul. 1998; 13, Nov. 1998; 14, positive control; 15, negative control.

과에서 *aacC2* 유전자만이 검출되고 *aacC1*, *aacC3* 및 *aacC4* 유전자가 검출되지 않은 것은 전보의 결과와 유사한 양상이라고 할 수 있으며, gentamicin에 대한 저항성을 나타내게 하는 다른 유전자에 비해 강한 저항성을 나타내는 *aacC2* 유전자가 높은 빈도로 분포하고 있다는 것을 암시한다.

Aerolysin 유전자의 검출을 위한 PCR primer인 *aero355*와 *aero356*은 *Aeromonas* 속의 aerolysin과 hemolysin 유전자의 conserved region을 이용하여 설계하였다. 설계된 primer set의 각 5'말단의 염기는 *A. hydrophila*의 aerolysin 유전자 염기서열의 5' 쪽으로부터 1316번째의 염기와 (*aero355*) 1715번째의 염기에 (*aero356*)에 해당한다(6). 이 primer set는 *Aeromonas* 속의 aerolysin 유전자로부터 414 bp를 증폭한다. 최적의 PCR 조건을 결정하기 위하여 *A. hydrophila* Ah65의 genomic DNA를 주형으로 사용하였고 Fig. 3은 aerolysin 유전자의 증폭된 결과를 보여주고 있다(lane 2). Aerolysin 유전자의 5' 말단으로부터 1015번째 염기를 절단하는 *MboII*를 이용하여 얻어진 PCR 산물을 절단한 결과 각각 227 bp와 187 bp의 DNA 절편을 확인할 수 있었다(Fig. 3, lane 3). 따라서 얻어진 PCR 산물이 aerolysin 유전자의 DNA 절편임을 확인하였다.

12개의 DNA 시료에서 aerolysin과 hemolysin 유전자를 검출하기 위해 PCR을 행한 결과 12개의 DNA 시료 중 7개의 시료에서 aerolysin 유전자가 검출되었다(Fig. 4A). 한편 Fig 4A의 gel을 사용하여 Southern hybridization을 실행한 결과 12개의 DNA 시료 중 10개의 시료에서 aerolysin 유전자가 검출되었다(Fig. 4B). 1996년부터 1998년까지 주암호에서 채수한 12개의 시료에서 gentamicin 저항성 유전자인 *aacC*와 *Aeromonas* 속 세균의 aerolysin 유전자를 검출한 결과 연도별 또는 계절적 발생 변화에서 의미 있는 차이는 발견되지 않았다. 이러한 결과는 *aacC2* 유

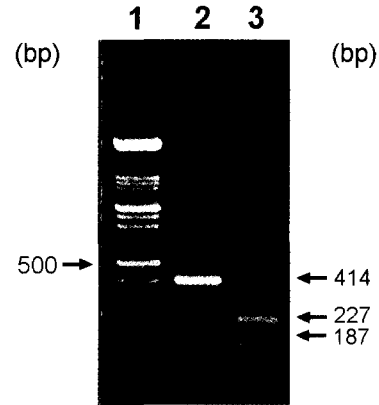


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of amplification product. A 414 bp fragment was amplified with primers, *aero355* and *aero356* from *Aeromonas hydrophila* Ah65. The product was digested with *MboII* to be verified as the internal aerolysin gene fragment. Lanes: 1, 100 bp-ladder marker; 2, amplification product; 3, *MboII* digested DNA.

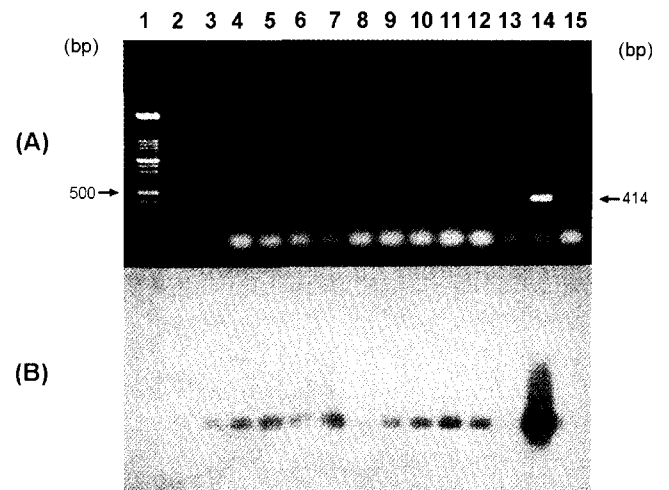


Fig. 4. PCR detection of aerolysin gene in water samples from Juam lake. Amplification fragments were detected with *aero355* and *aero356* primer set by which a 414 bp product was amplified (A). Southern hybridization of the same gel in panel A hybridized with aerolysin-specific probe (B). Lanes: 1, 100 bp-ladder marker; 2, Jan. 1996; 3, Apr. 1996; 4, Sep. 1996; 5, Nov. 1996; 6, Jan. 1997; 7, Apr. 1997; 8, Jul. 1997; 9, Oct. 1997; 10, Jan. 1998; 11, Apr. 1998; 12, Jul. 1998; 13, Nov. 1998; 14, positive control; 15, negative control.

전자와 aerolysin의 유전자가 주암호에서 계절과 무관하게 지속적으로 출현한다는 것을 의미한다.

저자 등이 전보(12)에서 DNA 추출 방법과 PCR의 최적조건을 검토하면서 세균의 DNA 검출 한계점을 측정된 결과 2 CFU/ml로 나타났다. 이 때 사용한 primer set는 물고기에게 병원성을 나타내는 *A. hydrophila*의 aerolysin 유전자의 염기서열(6)을 기초로 하여 설계된 것이다. 그러나 이 primer set를 이용한 PCR은 세포독성 인자를 생산하는 *A. hydrophila*의 일부와 *A. sobria*는 전혀 검출하지 못하였다(16). 따라서 임상 검체나 수계환경에서 사람에게 질병을 발생시킬 수 있는 다수의 *Aeromonas* 속의 세균

을 직접 검출하기 위하여 새로운 primer set의 설계가 필요하게 되었다. *aero355*와 *aero356* primer set는 *A. hydrophila*에서 보고된 5종류, *A. sobria*에서 1종류, 그리고 *A. salmonicida*에서 1종류, 총 7개의 aerolysin 유전자의 염기서열(7)을 비교하여 완전한 상동성을 보이는 부위를 찾아 설계되었기 때문에 이 primer set를 이용한 PCR assay는 *Aeromonas*속의 aerolysin 유전자 검출에 있어서 전보(12)에서 보다 민감도와 특이도가 높게 나타났다. 또한 본 실험에서 PCR-aided Southern hybridization이 PCR assay보다 높은 민감도를 나타냄으로써 세균의 DNA 검출 한계점 역시 PCR assay보다 낮아질 것으로 사료된다. 이러한 결과는 제조된 primers와 probe를 이용한 PCR-aided Southern hybridization이 수계 환경에서 다양한 미생물 군집의 특성을 감지하기 위한 민감한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- Brau, B., U. Pilz, and W. Piepersberg. 1984. Genes for gentamicin-(3)-N-acetyltransferase III and IV. Nucleotide sequence of the AAC(3)-IV gene and possible involvement of an IS140 element in its expression. *Mol. Gen. Genet.* 193, 179-187.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-382.
- Han, H.S., N.D. Kim, Y.J. Lee, H.Y. Lee, and J.S. Jung. 1997. Occurrence of Tn3 sequence upstream of *aacC2* gene in gentamicin resistance R plasmid. *Korean J. Microbiol.* 33(3), 165-169.
- Havelaar, A.H., F.M. Schets, A. van Silfhout, W.H. Jansen, G. Wieten, and D. van Der Kooij. 1992. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 435-444.
- Ho, B.S. and M.H. Ng. 1993. Development of a specific probe for the aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase resistance gene. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, 637-644.
- Howard, S.P., W.J. Garland, M.J. Green, and J.T. Buckley. 1987. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 169, 2869-2871.
- Husslein, V., Huhle, T. Jarchau, R. Lurz, W. Goebel, and T. Chakraborty. 1988. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the aerCaerA region of *Aeromonas sobria* encoding aerolysin and its regulatory region. *Mol. Microbiol.* 2, 980-997.
- Janda, J.M. 1991. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 397-410.
- Jung, J.S., H.Y. Lee, J.H. Chung. 1998. Increased expression of the gentamicin resistance gene by a Tn3 sequence located at the upstream region. *Mol. Cells* 8(2), 201-204.
- Jung, J.S., T.C. Cheong, M.S. Cho, Y.C. Hah, and J.H. Chung. 1994. Nucleotide sequence and expression of a gentamicin resistance gene isolated from the R plasmid in *Serratia marcescens*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198, 1084-1089.
- Jung, J.S., Y.J. Lee, J.H. Kim. 1999. Distributional pattern of *tetQ* and *aacC2* genes in stream water. *Korean J. Ecol.* 22, 305-309.
- Jung, J.S. and Y.J. Lee. 1997. Methods for the extraction of DNA from water samples for polymerase chain reaction. *J. Microbiol.* 35, 354-359.
- Lee, Y.J., H.S. Han, C.N. Seong, H.Y. Lee, and J.S. Jung. 1998. Distribution of genes coding for aminoglycoside acetyltransferases in gentamicin resistant bacteria isolated from aquatic environment. *J. Microbiol.* 36, 249-255.
- Monfort, P. and B. Baleux. 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1999-2006.
- Nakano, H., T. Kameyama, K. Venkateswaran, H. Kawakami, and H. Hashimoto. 1990. Distribution and characterization of hemolytic, and entropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment. *Microbiol. Immunol.* 34, 447-458.
- Pollard, D.R., W.M. Johnson, H. Lior, S.D. Tyler, and K.R. Rozee. 1990. Detection of the aerolysin genes in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2477-2481.
- Somerville, C.C., I.T. Knight, W.L. Strube, and R.R. Colwell. 1989. Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 548-554.
- Tenover, F.C., K.L. Phillips, T. Gilbert, P. Lockhart, P.J. O'Hara, and J.P. Plorde. 1989. Development of a DNA probe from the deoxyribonucleotide sequence of a 3-N-aminoglycoside acetyltransferase [AAC(3)-I] resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 551-559.
- Torsvik, V., J. Goksoyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
- van de Klundert, J.A.M. and J.S. Vliegthart. 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, p. 547-552. In D.H. Persing, T.E. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and application*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Vanhoof, R., J. Content, E. Van Bossuyt, E. Nulens, P. Sonck, F. Depuydt, J.M. Hubrechts, P. Maes, and E. Hannecart-Pokorni. 1993. Use of polymerase (PCR) for the detection of *aacCA* genes encoding aminoglycoside-6'-N-acetyltransferases in reference strains and Gram-negative clinical isolates from two Belgium hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 32, 23-35.
- Vliegthart, J. S., P. A. G. Ketelaar, and J. A. M. van de Klundert. 1991. Nucleotide sequence of the *aacC3* gene, a gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 892-897.
- Vliegthart, J.S., P.A.G. Ketelaar-Van Gaalen, and J.A.M. van de Klundert. 1990. Identification of three genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes by means of the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 25, 759-765.
- Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured inhabitants in a natural community. *Nature* (London) 345, 63-65.

(Received September 25, 2000/Accepted November 2, 2000)

ABSTRACT: Molecular Biological Detection of the Genes Encoding Aminoglycoside Acetyltransferases and Aerolysin in Water Samples from Juam Lake

Young Jong Lee,^{1,2} Hyo Sim Han,¹ and Jae Sung Jung^{1*} (¹Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, ²Department of Clinical Pathology, Kwangju Health College, Kwangju 506-701, Korea)

The *aacC1*, *aacC2*, *aacC3*, and *aacC4* genes, which encode aminoglycoside acetyltransferase AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-III, and AAC(3)-IV, respectively, and aerolysin genes in water samples from Juam lake were surveyed by polymerase chain reaction. Surface water was collected from January 1996 to December 1998, and then bacterial DNA was extracted from the water. Twelve samples were tested by PCR to survey the genes for aminoglycoside acetyltransferase and aerolysin in the lake water. The *aacC2* gene was detected in 9 of 12 DNA samples. Among 9 samples showing *aacC2* positive, 7 samples were associated with Tn3 sequence. However, none of the twelve samples amplified the expected DNA fragment for *aacC1*, *aacC3*, and *aacC4* genes. PCR primer to detect the aerolysin gene was designed using the conserved region of the genes for aerolysin and hemolysin of *Aeromonas* spp. This primer set successfully amplified the expected 414 bp PCR product with the DNA samples from the lake water. The aerolysin gene was detected in 7 of 12 DNA samples. When Southern hybridization of the gel with probe was performed, the aerolysin gene was detected in 10 of 12 DNA samples. However, the seasonal fluctuation of these genes was not found.