

발현 · 분비 벡터 및 임상 균주가 생성하는 신규 AmpC-type β -lactamase의 특성

정하일 · 성광훈 · 이정훈 · 장선주 · 이상희*

명지대학교 자연과학대학 생명과학정보학부

임상균주인 *Enterobacter* spp.가 생성하는 신규 chromosomal AmpC β -lactamases의 유전자형 및 진화적 측면을 고찰하기 위해서 항생제 감수성 시험, pI값 측정, DNA 염기서열 분석, 진화적 유연관계를 새로운 발현·분비 벡터를 이용하여 수행하였다. 6개 임상균주에서 cephamycins (cefotaxime and cefotetan), amoxicillin, cephalothin 및 amoxicillin-clavulanic acid에 내성 요인인 AmpC β -lactamase 유전자를 pMSG1219에 cloning하여 그 특성을 조사하였다. 381-amino-acid β -lactamase를 암호화 하는 4개의 ampC 유전자(*bla*_{EcloK992004.1}, *bla*_{EcloK995120.1}, *bla*_{EcloK99230} 및 *bla*_{EareK9911729})는 *E. cloacae* MHN1의 chromosomal ampC 유전자(*bla*_{EcloMHN1})와 99.6% 이상의 상동성을 나타냈으며 두 ampC 유전자(*bla*_{EcloK9973} and *bla*_{EcloK9914325})는 *E. cloacae* 908R의 chromosomal ampC 유전자(*bla*_{EcloQ908R})와 99.7% 상동성을 나타냈다. 이런 결과는 6개 ampC 유전자가 *bla*_{EcloMHN1} or *bla*_{EcloQ908R}로부터 유래되었음을 시사한다. 발현·분비 벡터를 이용하여 제조한 6개 transformant의 MIC값 양상 및 정확한 pI값은 *E. coli* 균주에 외부 유전자의 특성을 고찰하는 목적에 개발된 발현·분비 벡터(pMSG1219)가 유용함을 의미한다.

Key words □ AmpC β -lactamase, expression/secretion vector, *Enterobacter* infection

세균에 의해서 생성되는 β -lactamase(EC 3.5.2.6)는 세균의 세포벽 합성을 저해하는 항생제(penicillins, cephalosporins, 또는 monobactams)의 β -lactam ring을 분해한다. 특히, 임상에서 분리된 장내세균에 속하는 균주에 있어서 β -lactamase의 생성은 β -lactam계 항생제에 내성을 가지게 하는 가장 대표적인 형태이다(17). 다양한 β -lactamase들이 amino acid homology에 의거 A, B, C, D의 네 부류로 분류 되고 있다(4). 다양한 β -lactam계 항생제(cephamycins 및 broad-spectrum cephalosporins)에 내성을 가지게 하는 AmpC β -lactamase는 class C의 β -lactamase에 속한다. *Enterobacter* spp., *Shigella* spp. *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* 등의 균주가 chromosome성 AmpC β -lactamase를 생성함이 보고되었다(12). *Enterobacter* 종은 병원에서 획득되는 병원감염균(nosocomial pathogens)으로서 점차로 그 심각성이 증가되고 있다(18). *Enterobacter*에 의한 원내감염의 중요한 원인은 항생제의 오·남용, 장기입원, 중증감염에 의한 신체의 약화, 면역기능의 저하, 치료용 기구의 신체내부 삽입 등임이 밝혀졌다(2). *Enterobacter* 임상 균주에서 AmpC 내성요인(AmpC resistance determinants)의 확산이란 측면에서 AmpC 내성 기작을 규명하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 국내 병원에서 분리된 *Enterobacter* spp.에서 새로운 AmpC β -lactamase의 유전형 및

그 특성을 개발된 발현·분비 벡터를 이용하여 고찰하였다.

재료 및 방법

사용균주

새로운 AmpC β -lactamase를 생성하는 *Enterobacter cloacae* 5 균주 및 *E. aerogenes* 1 균주는 대한민국 부산 소재의 고신대 복음병원에서 1998년 6월부터 1999년 5월 사이에 분리되었으며, 분리된 균주들은 전통적인 방법(5) 혹은 Vitek GNI card (bioMérieux Vitek Inc., Hazelwood, MO, USA)에 의해 동정되었다. 이 균주들에 대한 내용은 Table 1에 제시되었다. *E. coli* ATCC 25922는 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration; MIC) 측정을 위한 참조균주로, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen, Wisconsin, WI, USA)는 expression host로 사용되었다.

항생제에 대한 최소억제농도 조사

Amoxicillin 등 11종의 β -lactam계 항생제에 대한 최소억제농도는 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards criteria)의 기준(13)에 따라 한천배지희석법을 이용하여 측정하였다.

PCR 증폭 및 DNA 서열 분석

PCR 수행을 위해 5개 AmpC-type (*bla*_{AmpC}) 유전자를 각각 Primer Calculator program (Williamstone Enterprises, Waltham, MA, USA)을 사용하여 alignment해서 consensus sequence를 확

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (031) 330-6195, Fax: (031) 335-8249
E-mail: sangheeLEE@mju.ac.kr

Table 1. Profiles of six clinical isolates

Strain	Species	Type of infection	MICs (mg/L) of β -lactams ^a										
			AMX	AUG	LOT	TAX	TAZ	ATM	FEP	IMP	MER	FOX	TTN
K9973	<i>E. cloacae</i>	UTI	>256	128	>256	32	256	256	4	0.25	0.25	256	256
K99230	<i>E. cloacae</i>	Pneumonia	>256	256	>256	32	128	128	2	0.5	0.125	128	256
K992004.1	<i>E. cloacae</i>	Wound infection	>256	256	>256	16	256	256	4	0.25	0.125	256	256
K995120.1	<i>E. cloacae</i>	Wound infection	>256	128	>256	32	128	128	2	1	0.125	256	256
K9911729	<i>E. aerogenes</i>	Pneumonia	>256	>256	>256	32	64	128	1	0.5	0.25	>256	128
K9914325	<i>E. cloacae</i>	UTI	>256	128	>256	32	128	128	4	0.5	0.125	128	64

^aAMX, amoxicillin; AUG, amoxicillin-clavulanic acid; LOT, cephalothin; TAX, cefotaxime; TAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; FOX, ceftoxitin; TTN, cefotetan; UTI, urine tract infection.

인하여 고안하였다. 고안된 primer는 Table 3의 처음 6개이다. 즉, *bla*_{AmpC} 유전자 분리를 위한 primer는 AmpCF1, AmpCR1, A1, A2, A3 및 A4이다. DNA 증폭 조건 및 DNA sequencing은 Lee 등의 방법을 따랐다(9, 10). DNA 서열분석은 DNASIS for Windows (Hitachi Software Engineering America Ltd., San Bruno, CA, USA)를 이용하였다. 염기서열 및 추론된 아미노산 서열과 유사한 서열의 조사는 NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 실행하였다. Joseph Felsenstein (Department of Genetics at the University of Washington)의 PHYLIP package에 있는 PRODIST (Protein Distance Matrix) 및 FITCH (Fitch-Margoliash and Least-Squares Distance Methods) 프로그램, 16개 *ampC* genes의 CLUSTAL W multiple sequence alignment(19)를 이용하여 진화적 유연관계(phylogenetic tree)를 조사하였다. 16개 *ampC* gene은 Table 2에 제시되었다.

Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 획득한 genomic DNA를 nylon membrane (Hybond-N; Amersham International, Buckinghamshire, England)

Table 2. Distribution of AmpC β -lactamases and the gene sequence accession numbers used for phylogenetic studies

β -Lactamase	Source (Accession number)
EcloQ908R	<i>E. cloacae</i> Q908R (X08081), chromosomal
EcloMHN1	<i>E. cloacae</i> MHN1 (X08082), chromosomal
EcloCHE	<i>E. cloacae</i> CHE (AJ278994), chromosomal
EcloGC1	<i>E. cloacae</i> GC1 (D44479), chromosomal
EcloGN747	<i>E. cloacae</i> GN747 (AB016611), chromosomal
EcloODHy	<i>E. cloacae</i> ODHy (AJ278995), chromosomal
EcloP99	<i>E. cloacae</i> P99 (X07274), chromosomal
Eare1	<i>E. aerogenes</i> (AF211348), chromosomal
EcloK992004.1	<i>E. cloacae</i> K992004.1 (AF411144), chromosomal
EcloK995120.1	<i>E. cloacae</i> K995120.1 (AF411145), chromosomal
EcloK99230	<i>E. cloacae</i> K99230 (AF411146), chromosomal
EcloK9911729	<i>E. cloacae</i> K9911729 (AF411147), chromosomal
EcloK9973	<i>E. cloacae</i> K9973 (AF411148), chromosomal
EcloK9914325	<i>E. cloacae</i> K9914325 (AF411149), chromosomal
MIR-1	<i>K. pneumoniae</i> (M37839), plasmid-encoded
ACT-1	<i>K. pneumoniae</i> MCQ-95 (U58495), plasmid-encoded

으로 옮겼으며 primer AmpCF1과 AmpCR1간의 PCR 산물은 digoxigenin (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 이용하여 labeling하였다. Hybridization은 68°C에서 Roche Applied Science사의 digoxigenin kit에서 권고하는 방법으로 수행하였다.

발현·분비 벡터 제조 및 *ampC* 유전자의 cloning

발현·분비 벡터 제조과정은 Fig. 1에 제시되었다. 1998년에 고신대 복음병원에서 분리되었으며 cephalothin, ceftoxitin, cefotetan, cefamandole, ceftazidime, amoxicillin-clavulanic acid 및 aztreonam에 내성을 보였던 *E. coli* K983802.1이 지니고 있는 plasmid인 pYMG-2(9)를 PCR template로 이용하였다. 이용된 primer는 C-*Nde*IF 및 N-*Xho*IB이었다. 두 primer는 끝부분에 *Nde*I(C-*Nde*IF) 및 *Xho*I(N-*Xho*IB)의 recognition sequence를 포함하고 있다(Table 3). 모든 restriction enzyme들은 Roche Applied Science (Mannheim, Germany)의 제품을 사용하였다. C-*Nde*IF 및 N-*Xho*IB primer는 structural gene (CMY-11) (9)의 양 끝부분에 존재하며 original gene의 모든 조절 부위는 다음의 cloning 과정에서 제거되었다. PCR 증폭은 DNA thermal cycler (Mod 2400; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)을 이용하여 Lee 등의 방법(11)을 사용하였다. 원하는 1,179 bp 크기의 PCR 산물은 agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였다. *Nde*I/*Xho*I에 의해 digestion된 PCR 산물은 *Nde*I/*Xho*I로 자른 pET-30a(+) vector (Novagen, Wisconsin, WI, USA)에 ligation되었다. 형성된 재조합 plasmid를 pMSG1217로 명명하였다(Fig. 1A). 발현·분비 벡터 제조를 위한 PCR template는 pMSG1217, primer는 UP-26b (*Sph*I 인식 부위를 함유) 및 Sp-HIS-*Sac*I(Table 3)를 사용하여 608 bp 크기의 PCR 산물을 얻었다. *Sph*I/*Sac*I에 의해 digestion된 PCR 산물은 *Sph*I/*Sac*I로 자른 pET-30a(+) vector에 ligation되었다. 형성된 재조합 plasmid pMSG1219는 isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside (IPTG, 0.5 mM)로 induction시켜서 발현이 되며 CMY-11의 신호서열(signal peptide)에 의해서 분비되는 발현·분비 벡터이다(Fig. 1C).

ampC gene cloning을 위한 PCR template는 6개의 임상균주로부터 분리된 chromosomal DNA, primer는 AmpCF1(*Eco*RI 인식 부위를 함유) 및 AmpCR1(*Sac*I 인식 부위를 함유, Table 3)을 사용하여 1,165 bp 크기의 PCR 산물을 얻었다. *Eco*RI/*Sac*I에 의해 digestion된

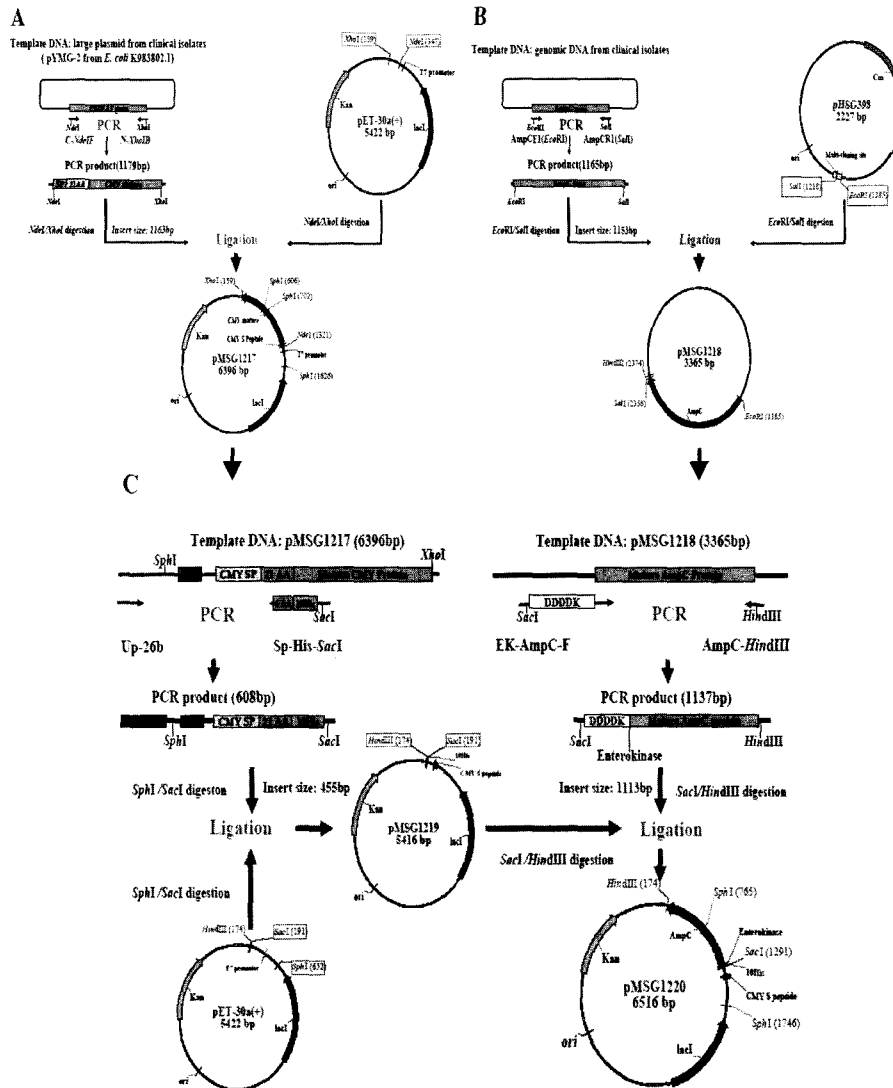


Fig. 1. Construction of pMSG1217 (A), pMSG1218 (B), pMSG1219 (C), and pMSG1220 (C). Construction procedure of each vector was described in Materials and Methods.

PCR 산물은 *EcoRI/SacI*로 자른 pHSG398 vector (TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan)에 ligation되었다. 형성된 재조합 plasmid를 pMSG1218 (*E. cloacae* K9992004.1의 경우는 pMSG1218-1, *E. cloacae* K995120.1의 경우는 pMSG1218-2, *E. cloacae* K99230의 경우는 pMSG1218-3, *E. aerogenes* K9911729의 경우는 pMSG1218-4, *E. cloacae* K9973의 경우는 pMSG1218-5, *E. cloacae* K9914325의 경우는 pMSG1218-6)로 명명하였다(Fig. 1B). 발현·분비 벡터인 pMSG1219의 성능을 시험하기 위한 PCR template는 pMSG1218, primer는 EK-AmpC-F(*SacI* 인식 부위를 함유) 및 AmpC-*HindIII* (Table 3)를 사용하여 1,137 bp 크기의 PCR 산물을 얻었다. *SacI/HindIII*에 의해 digestion된 PCR 산물은 *SacI/HindIII*로 자른 pMSG1219 vector에 ligation되었다. 형성된 재조합 plasmid를 pMSG1220 (*E. cloacae* K9992004.1의 경우는 pMSG1220-1, *E. cloacae* K995120.1의 경우는 pMSG1220-2, *E.*

cloacae K99230의 경우는 pMSG1220-3, *E. aerogenes* K9911729의 경우는 pMSG1220-4, *E. cloacae* K9973의 경우는 pMSG1220-5, *E. cloacae* K9914325의 경우는 pMSG1220-6)으로 명명하였다 (Fig. 1C). Ligation mixture는 transformation을 통해 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) competent cell에 도입시켰다. Transformant는 ampicillin (50 mg/L), kanamycin (50 mg/L)이 포함되어 있는 Luria-Bertani (Difco Laboratories) agar plates에서 selection되었다. 원하는 pMSG1220은 Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)를 이용하여 분리하였으며 insert (*bla_{AmpC}* 유전자)의 여부는 restriction enzyme을 이용한 분석을 통해서 확인하였다. 모든 *bla_{AmpC}* 유전자는 automatic sequencer (Mod. 373A; Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany)를 이용하여 direct sequencing하였다(7).

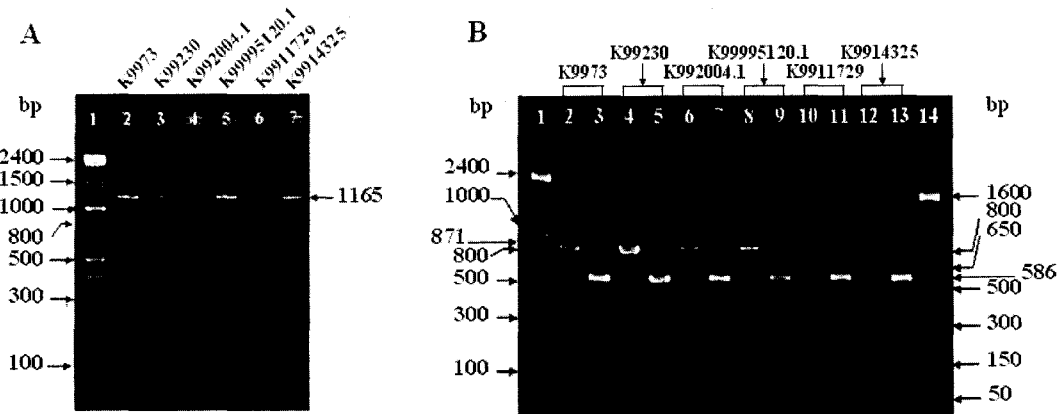


Fig. 2. Banding patterns of PCR products of *bla*_{AmpC} in six clinical isolates. Lane 1 (A and B) and lane 14 (B), 50 ladder or 100 ladder, DNA marker fragments (size in bp are indicated on the edge of the gel). A, PCR products (1,165 bp) of *bla*_{AmpC} with primer pair of AmpCF1 and AmpCR1. B, PCR products (871 bp) of *bla*_{AmpC} with primer pair of A1 and A2, PCR products (586 bp) of *bla*_{AmpC} with primer pair of A3 and A4.

-lactamase만이 특징적으로 갖고 있는 활성부위 잔기인 SXXX (serine-isoleucine-serine-lysine)(6) 서열이 있었다. *bla*_{EcloK992004.1}, *bla*_{EcloK995120.1}, *bla*_{EcloK99230} 그리고 *bla*_{EareK9911729}는 *E. cloacae* MHN1의 chromosomal *ampC* 유전자(*bla*_{EcloMNH1})와 매우 큰 상동성을 나타냈다(각각 99.9, 99.7, 99.6 그리고 99.6% 염기서열 identity). *bla*_{EcloK9973} 및 *bla*_{EcloK9914325}는 *E. cloacae* Q908R의 chromosomal *ampC* 유전자(*bla*_{EcloQ908R})와 매우 큰 상동성을 나타냈다(각각 99.7, 99.7% 염기서열 identity). 이런 높은 상동성은 *bla*_{EcloK992004.1}, *bla*_{EcloK995120.1}, *bla*_{EcloK99230} 그리고 *bla*_{EareK9911729}는 *bla*_{EcloMNH1}로부터, *bla*_{EcloK9973} 및 *bla*_{EcloK9914325}는 *bla*_{EcloQ908R}로부터 유래됨을 시사한다. 6개 *ampC* 유전자 산물 및 다른 AmpC β-lactamase간의 아미노산 서열을 비교한 결과, 6개 AmpC β-lactamase는 *E. cloacae* MHN1의 AmpC와 가장 큰 상동성(98.1~100%)을 나타냈으며 다음으로 MIR-1(8)(86.6~87.1%), ACT-1(3)(87.4~87.7%), *E. aerogenes*의 AmpC(15)(74.8~75.1%)와 유사하였다. 지금까지 보고 된 chromosomal class C β-lactamase는 36개 이다(1). Chromosomal class C β-lactamase (cephamycinase)를 생성하는 균주의 증가는 cephamycin에 내성인 균주가 장내세균에 확산될 가능성이 높아짐을 의미한다. 진화적 유연관계(phylogenetic tree)를 분석한 결과, 16개의 class C β-lactamase는 3개의 subclass로 구분되었다(Fig. 3). 즉, 1a (EcloMNH1, EcloK992004.1, EcloK995120.1, EcloK99230 및 EareK9911729), 1b (EcloGC1, EcloP99, EcloCHE, EcloQ908R, EcloK9973 및 EcloK9914325) 그리고 1c (EcloODHy, Eare1, EcloGN747, MIR-1 및 ACT-1)이었다. 이런 결과는 plasmid 성 MIR-1 및 ACT-1이 chromosome에 존재하는 *bla*_{EcloGN747}같은 chromosomal *ampC* 유전자로부터 유래하였음을 의미하며 이는 다른 보고(18)에 의해서도 입증되었다.

발현 · 분비 벡터 및 transformants의 특성

발현 · 분비 벡터(pMSG1219)에 *ampC* 유전자가 삽입된 pMSG 1220을 *E. coli* *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 균주에 transformation

시킨 후에 그 유전자가 발현 및 분비되었을 경우, transformant (trf K9973 및 trf K9914325; trf K99230 및 trf K9911729; trf K992004.1 및 trf K995120.1)의 amoxicillin에 대한 MIC값은 clavulanic acid에 의해서 감소되지 않았다(Table 4). 이는 전형적인 class C-lactamase가 갖는 특성이다(4). 6개 transformant 중 두개의 transformant (trf K9973 및 trf K9914325; trf K99230 및 trf K9911729; trf K992004.1 및 trf K995120.1)는 모든 β-lactams에 대한 MIC 값이 서로 비슷하였다(Table 4). trf K992004.1 및 trf K995120.1의 모든 β-lactams에 대한 MIC 값이 가장 높았으며 trf K9973 및 trf K9914325의 모든 β-lactams에 대한 MIC 값이 가장 낮았다(Table 4). trf K9973 및 trf K9914325의 cefoxitin 과 cefotetan에 대한 MIC값은 trf K992004.1 및 trf K995120.1의 경우보다 8배 내지 16배 높았으며 trf K99230 및 trf K9911729의 cefoxitin 및 cefotetan에 대한 MIC값은 trf K992004.1 및 trf K995120.1의 경우보다 4배 높았다. 이러한 사실은 병원에서 cefoxitin 및 cefotetan을 많이 사용하면서 *bla*_{EcloK992004.1} 및 *bla*_{EcloK995120.1}로부터 *bla*_{EcloK99230} 및 *bla*_{EareK9911729}로 진화되었음을, 또는 *bla*_{EcloK992004.1} 및 *bla*_{EcloK995120.1}로부터 *bla*_{EcloK9973} 및 *bla*_{EcloK9914325}로 진화(*in vivo* evolution) 되었음을

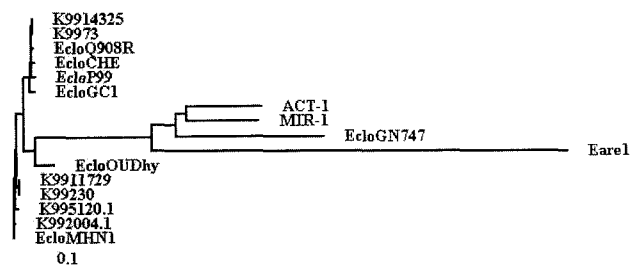


Fig. 3. Phylogram of 16 *ampC* β-lactamase genes. The branch length value represents relative phylogenetic distance. Abbreviations for taxon labels, accession numbers, gene locations (plasmid or chromosome), and organism names are given in Table 2.

Table 4. Profiles of transformants (trf) of six clinical isolates and host [*E. coli* BL21 (DE3) pLysS] for transformation

Species	Strain	MICs (mg/L) of β -lactams ^a										
		AMX	AUG	LOT	TAX	TAZ	ATM	FEP	IMP	MER	FOX	TTN
trf K9973	<i>E. coli</i>	128	128	>256	8	16	4	0.125	0.25	<0.06	8	4
trf K99230	<i>E. coli</i>	128	128	>256	32	16	8	0.25	0.5	<0.06	16	8
trf K992004.1	<i>E. coli</i>	16	16	32	1	0.5	0.5	0.125	0.25	<0.06	2	1
trf K995120.1	<i>E. coli</i>	16	16	32	1	0.5	0.5	0.125	0.25	<0.06	2	1
trf K9911729	<i>E. coli</i>	128	128	>256	32	32	16	0.25	0.5	<0.06	16	16
trf K9914325	<i>E. coli</i>	64	64	>256	16	16	4	0.25	0.25	<0.06	8	4
pLysS	<i>E. coli</i>	1	1	2	<0.06	0.125	<0.06	0.06	0.25	<0.06	<0.06	<0.06

^aAMX, amoxicillin; AUG, amoxicillin-clavulanic acid; LOT, cephalothin; TAX, cefotaxime; TAZ, ceftazidime; ATM, aztreonam; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; FOX, ceftioxin; TTN, cefotetan.

시사한다. 이는 진화적 유연관계(phylogenetic tree, Fig. 3)에서도 추론되었으며 *bla*_{SHV-8}의 경우에서 같은 진화적 축면이 보고 되었다(16). 이런 이유로 내성 유전자의 확산을 방지하기 위해서 cefoxitin 및 cefotetan같은 항생제의 통제된 사용이 필요할 것으로 생각된다. 모든 transformant에서 발현 및 분비된 AmpC β -lactamase는 native gel상에서 기질인 nitrocefin을 분해하였으며 pI 값은 모두 8.9이었고 AmpC β -lactamase인 MOX-1(7)의 pI값과 동일하였다(자료 미제시). 이러한 사실들은 임상균주에서 발견 되는 AmpC β -lactamase 유전자 (외부 유전자)를 *E. coli* 균주에 발현 및 분비시키기 위한 목적에 본 연구에서 개발된 발현·분비 벡터가 효과적으로 작동됨을 시사한다.

감사의 글

이 연구는 2004년도 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Barlow, M. and B.G. Hall. 2002. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1190-1198.
- Bauernfeind, A., I. Stemplinger, R. Jungwirth, R. Wilhelm, and Y. Chong. 1996. Comparative characterization of the cephamycinase *bla*_{CMY-1} gene and its relationship with other β -lactamase genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1926-1930.
- Bradford, P.A., C. Urban, N. Mariano, S.J. Projan, J.J. Rahal, and K. Bush. 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 563-569.
- Bush, K., G.A. Jacoby, and A.A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1211-1233.
- Farmer, J.J. III. 1999. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification, p. 442-458. In P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, Washington.
- Ghuysen, J.M. 1991. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 37-67.
- Horri, T., Y. Arakawa, M. Ohta, T. Sugiyama, R. Wacharotayanankun, H. Ito, and N. Kato. 1994. Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed *bla*_{MOX-1} gene encoding AmpC-type β -lactamase. *Gene* 13, 93-98.
- Jacoby, G. and J. Train. 1999. Sequence of the MIR-1 β -lactamase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1759-1760.
- Lee, S.H., J.Y. Kim, G.S. Lee, S.H. Cheon, Y.J. An, S.H. Jeong, and K.J. Lee. 2002. Characterization of *bla*_{CMY-11}, an AmpC-type plasmid-mediated β -lactamase gene in a Korean clinical isolate of *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 269-273.
- Lee, S.H., J.Y. Kim, S.K. Lee, W. Jin, and K.J. Lee. 2000. Discriminatory detection of extended-spectrum β -lactamases by restriction fragment length dimorphism-polymerase chain reaction. *Let. Appl. Microbiol.* 31, 307-312.
- Lee, S.H., S.H. Jeong, Y.-M. Park. 2003. Characterization of *bla*_{CMY-10}, a novel, plasmid-encoded AmpC-type β -lactamase gene in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 95, 744-752.
- Livermore, D.M. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing, 11th informational supplement M100-S11. Villanova, PA.
- Pitout, J.D.D., K.S. Thomson, N.D. Hanson, A.F. Ehrhardt, P. Coudron, and C.C. Sanders. 1998. Plasmid-mediated resistance to expanded-spectrum cephalosporins among *Enterobacter aerogenes* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 596-600.
- Preston, K.E., C.C. Radomski, and R.A. Venezia. 2000. Nucleotide sequence of the chromosomal *ampC* gene of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3158-3162.
- Rasheed, J.K., C. Jay, and B. Metchock. 1997. Evolution of extended-spectrum beta-lactamase resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 647-653.
- Sanders, C.C. and Jr. W.E. Sanders. 1992. β -Lactamase in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect.*

- Dis.* 15, 824-839.
18. Sanders, W.E., Jr. and C.C. Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the run of the century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 220-241.
19. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL

W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

(Received 24 May, 2004/Accepted 10 June, 2004)

ABSTRACT : Characterization of Noble AmpC-Type β -Lactamases Among Clinical Isolates Using New Expression/Secretion Vector

Ha Il Jung, Kwang Hoon Sung, Jung Hun Lee, Seon Ju Jang, and Sang Hee Lee* (Department of Biological Science, Myongji University, Yongin, Kyunggido 449-728, Korea)

To determine evolution and genotype of new chromosomal AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacter* species, we performed antibiotic susceptibility testing, pI determination, sequencing, and phylogenetic analysis using developed expression/secretion vector. Six isolates have shown to produce AmpC β -lactamases. Six genes of AmpC β -lactamases that are responsible for the resistance to cephamycins (cefoxitin and cefotetan), amoxicillin, cephalothin, and amoxicillin-clavulanic acid were cloned and characterized in pMSG12119. Insert fragment containing the *ampC* genes was sequenced and found to have an open reading frame coding for 381-amino-acid β -lactamase. The nucleotide sequence of four *ampC* genes (*bla*_{EcloK992004.1}, *bla*_{EcloK995120.1}, *bla*_{EcloK99230}, and *bla*_{EareK9911729}) shared considerable homology with that of chromosomal *ampC* gene (*bla*_{EcloMHN1}) of *E. cloacae* MHN1 (more than 99.6% identity). The sequences of two *ampC* genes (*bla*_{EcloK9973} and *bla*_{EcloK9914325}) showed close similarity to the chromosomal *ampC* gene (*bla*_{EcloQ908R}) of *E. cloacae* 908R (99.7% identity). The results from phylogenetic analysis suggested that six *ampC* genes could be originated from *bla*_{EcloMHN1} or *bla*_{EcloQ908R}. MIC patterns and exact pI values of six transformants indicated that the developed expression/secretion vector (pMSG1219) was suitable for the characterization of foreign genes in *E. coli* strain.