

Multiplex PCR을 이용한 어병 세균내의 *tet* gene 분석

전려진 · 정준범 · 유민호 · 정현도
부경대학교

서론

담수어 및 해산어에서 발생되어 큰 피해를 주고 있는 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Aeromonas* 등의 그람음성균은 주로 tetracycline(Tc)계 약물에 대해 내재성 막 단백질로 인하여 일어나는 Tc의 energy-dependent efflux 내성 기작을 가지며, efflux gene 중 *tet* A, B, C, D, E, G가 분포한다고 알려져 있다 (Roberts, M. C. 1996). 본 연구에서는 양식 현장에서 tetracycline 내성균을 분리하였으며 이들이 갖는 내성 유전자 분석을 위하여 *tet* A, B, C, D, E, G에 대한 specific primers를 제작한 후 single PCR을 실시하였고 또한, 경제적 · 시간적 손실을 최소화하기 위하여 multiplex PCR도 실시하였다. 이를 통하여 우리 나라 양어장의 어병 세균에서는 어떤 종류의 *tet* gene이 널리 분포되어 있는지 PCR 기법을 이용해 확인함으로써 내성 유전자의 기원을 분석하여 현재 어병 세균에 분포되어 있는 내성 gene의 근원과 다양성을 간접적으로 추정하고자 하였다.

재료 및 방법

Bacterial strains : 여수 수산대 어병학과와 부경대 미생물학과에서 *Escherichia coli* pJA8122, *Escherichia coli* R222, *Escherichia coli* pPT3, *Escherichia coli* pBR322를 분양 받아 *Edwardsiella tarda* RE1, *Aeromonas hydrophila*와 같이 표준 균주로 이용하였다.

Antibiotic resistance test : Tetracycline에 대한 최소억제농도(MIC)의 측정 및 다른 항생제에 대한 내성 test는 Wood&Washington (1995)의 방법을 이용하였다.

Primer design : 인터넷 GenBank(EMBL)로부터 약 1.2kbp 크기의 *tet* gene A, B, C, D, E, G sequence를 찾아 conserve 되어 있는 앞부분을 sense primer로 사용하였고, 각각의 *tet* gene에 대한 specific한 antisense primer는 variable한 뒷부분에서 사용하였으며, PCR product 크기는 전기영동시 각각의 gene이 size에 의해 구별되도록 제작하였다.

Template DNA preparation : 실험에 사용된 균주로부터 Chen&Kuo (1993)의 방법으로 total DNA를 분리하였다.

PCR test : Single PCR에서는 *tet* A, B, C, D, E, G의 각각을 specific하게 증폭할 수 있도록 1 set씩의 primers를 사용하였고, multiplex PCR에서는 sense primer 1개와 antisense primers 6개 모두를 사용하여 증폭시켰으며, PCR products는 EtBr이 첨가된 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 요약

우리나라의 동해안과 남해안 일대의 양어장에서 1993년부터 2001년까지 어류에 병원성을 나타내며 tetracycline에 내성을 가지는 34개의 균을 분리하였고, 이들 균주의 MIC 농도는 $\geq 12.5\mu\text{g/ml}$ 이었다. 분리된 34개의 균주 중 *Edwardsiella tarda*가 19균주, *Vibrio* sp.가 11균주, *Proteus mirabilis* 2균주, *Aeromonas hydrophila*와 *Acinetobacter lwoffii*가 각각 한 균주로 동정되어 분석 대상이 된 대부분의 병어는 *E. tarda*와 *Vibrio* 계열에 감염된 것으로 추정할 수 있었다. 본 실험에서 제작된 각각의 *tet* gene에 specific한 primer를 사용하여 PCR을 실시한 결과, *tet* A, B, C, D, E, G의 각각에 대해 PCR products를 얻을 수 있었다. 또한, 하나의 template에 6개의 antisense primers를 사용하는 multiplex PCR을 실시한 결과, single PCR 때와 동일한 band를 얻을 수 있어 본 방법의 특이적 PCR 반응을 확인할 수 있었다. 각 *tet* gene을 plasmid에 cloning한 후 다시 그 plasmid를 분리하여(Kado and Liu 1981) *tet* A, B, C, D, E, G가 포함된 plasmids 모두를 혼합한 multitemplates를 이용해 multiplex PCR을 실시한 결과, 6개의 PCR products를 얻을 수 있었다. 그러나 *tet* A, B, C, D, E, G를 가진 각각의 내성균으로부터 분리한 total DNA를 이용해 동일한 방법으로 PCR을 실시한 결과, 균의 숫자 또는 내성 유전자의 copy수의 차이 때문에 각각의 *tet* 유전자에 대한 증폭된 PCR 생성물이 양적 차이를 보여 4개의 PCR products만을 얻을 수 있었다. Multiplex PCR을 이용해서 채집 내성균주의 *tet* gene을 분석한 결과, *E. tarda*에서 8 균주가 *tet* A, 7 균주가 *tet* D, 2 균주가 *tet* B로 나타났다. *E. tarda*의 두 균주에서 각각 *tet* A·G, *tet* A·D로 두 개의 *tet* gene을 보였으며, *Vibrio* sp. 균주에서는 모두 *tet* B를 보였다는 것이 흥미로웠다. Roberts, M. C. (1996)의 이전 보고에 따르면, *E. tarda*에서는 *tet* A, D만 검출되며 *Vibrio* sp.에서는 *tet* A, B, C, D, E, G 모두가 발견된다고 보고되어졌는데, 이번 연구 중 *E. tarda*에서 *tet* B가 발견되고 *Vibrio* sp.는 *tet* B만이 발견되어 보고된 것과 차이가 있는 것으로 나타났다. 그러므로 더 많은 균들의 내성 여부를 조사하는 것이 필요하다고 생각되어진다.

참고문헌

- Chen W. and Kuo T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 2260.
- Kado C.I. and Liu S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *Journal of Bacteriology* 145: 1365-1373.
- Roberts M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants : mechanism of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 1-24.
- Woods G.L. and Washington J.A. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology* 6th edn ed. Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C. and Tenover F.C. and Tenover F.C. and Tenover F.C. pp.1327-1341. Washington D.C.: American Society for Microbiology.