

돌돔의 장내 세균총에서 분리한 *Vibrio* spp.의 항생제 내성 특성 분석

김재훈 · 전려진 · 류지효 · 조혜진 · 정준범 · 정현도
부경대학교 수산생명의학과

서 론

세균의 β -lactam 항균제에 대한 내성 기전에는 (1) β -lactamase의 생성, (2)PBPs의 변화, (3)약물의 세균 내 투과 억제 그리고 (4)약물의 세포 외 배출 증가 등을 들 수 있다. 이 중 그람 음성 세균에서는 β -lactamase 생성에 의한 항균제 불활화가 가장 빈번하게 나타나고 있다 (Mabilat and Gaussard, 1993). *Vibrio* spp.에서 ampicillin 내성에 관여하는 β -lactamase에 관한 연구는 드물게 보고되어져 있으며, 그나마 연구된 β -lactamases 대부분은 *Vibrio cholerae*에 편향되어 있고 Non-cholera vibrios (NCV)에 대한 연구는 부족한 실정이다 (Ottaviani *et al.*, 2001; Zanetti *et al.*, 2001). 현재 *Vibrio cholerae*에서는 CARB family가 알려져 있고 NCV에는 *Vibrio harveyi*의 VHH-1, VHW-1과 *Vibrio fisheri*의 β -lactamase, *Vibrio parahaemolyticus*의 β -lactamase, *Vibrio alginolyticus*의 VAK-1가 알려져 있다 (Teo *et al.*, 2000; Weng *et al.*, 2004; NCBI access No. BA000032; 김 등, 2005).

이번 연구에서는 ampicillin에 내성을 나타내는 *Vibrio* spp.에서 지금까지 보고되어지지 않은 새로운 β -lactamase를 확인하였고 현재까지 보고되어진 *Vibrio* spp.에서의 β -lactamases들과 특성을 비교해 보았다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균체는 2004년 통영 지역의 건강한 상태의 돌돔 장에서 ampicillin이 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 함유되어있는 TCBS (Difco)배지를 사용하여 분리하였다.

Broth dilution method에 의하여 ampicillin (AMP, Sigma), penicillin (P, Sigma), cefoxitin (FOX, Sigma), cephalixin (CPL, Sigma), cefamandole (CFM, Sigma), cefadroxil (CFD, Sigma), ceftriaxone (CFA, Sigma), piperacillin (PIP, 유한양행), amoxycillin/clavulanic acid (AMC, 유한양행), amoxycillin (AMO, 다원케미컬), cefotaxime (CFX, 한미약품), ceftazidime (CAZ, GSK), cefuroxime (CFM, GSK)에 대한 최소 증식 저지 농도 (Minimal Inhibition Concentrations, MICs) 값을 측정함으로써 분리균의 약제 감수성을 측정 하였다 (김, 1997).

배양된 ampicillin 내성 *Vibrio* spp.의 DNA를 Phenol/Chloroform 법으로 추출한 후 1unit/ DNA ug의 *Hind*III (Roche)를 37°C에서 3시간 처리 한 후 동일하게 제한효소로 처리한 pHSG398 vector (Takara)와 함께 혼합하여, 16°C에서 ligation 반응을 시도 하였다. Ligation 반응 후 mixture를 *E. coli* DH5a competent cell에 transformation하고 ampicillin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 들어 있는 LB agar 배지에 도말 하였다. 18시간 배양하여 transformants를 선별하고 QIAGEN의 miniprep plasmid 분리 kit를 사용하여 plasmid를 분리하였다. 이를 Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 plasmid 내에 insertion된 염기서열을 밝혀 냈고, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 blasting 하여 알려진 다른 β -lactamases와 비교해 보았다.

결과 및 요약

Ampicillin 내성 *Vibrio* spp.의 DNA와 pHSG398 vector를 이용한 cloning 결과 ampicillin과 chloramphenicol에 내성을 나타내는 transformants를 확인하였다. Transformant로부터 분리된 plasmid로부터 cloning 된 DNA fragment를 sequencing하여 3개의 ORF로 구성된 총 3971 bp의 DNA sequence를 결정 할 수 있었다.

Cloning 된 ORF 1을 다른 β -lactamases와 비교해 보았을 때 *Vibrio harveyi*에서 보고된 VHW-1과 가장 유사한 82%의 상동성을 나타내었으며 *Vibrio parahaemolyticus* RIMD의 β -lactamase와는 76%의 상동성을 나타내고 있었다. Neighbor-joining 방법을 통한 계통수 분석 결과도 이와 유사한 결과를 나타내었다. 그리고 amino acid 서열 분석에서 class A β -lactamase의 genetic motifs (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995)인 아미노산 서열 62-66번째의 STFK, 아미노산 서열 122-124번째에 위치한 SDN loop와 158번째에 위치한 Glu, 226-228번째의 RSG를 확인할 수 있었다. 그러므로 ampicillin에 대한 내성 발현, 지금까지 알려진 β -lactamase와 최대 82%의 DNA sequence identity, 그리고 β -lactamase 단백질의 주요 motifs 존재가 있음을 보여 준 본 연구의 결과들은 cloning 된 ORF 1이 새로운 type의 β -lactamase 유전자임을 확인 할 수 있게 하였다.

Cloning 된 ORF의 발현 조절 부위로는 시작 codon 앞에 AGAAA의 ribosomal binding site를 확인 하였고 -35는 TCGTTA, -10은 CAAAGT임을 확인 하였다. 또한 종결 codon 뒤로 hair-pin loop 구조를 확인 할 수 있었다. Signal peptides는 MKKLLLLMGLLAFSSATYA로 확인 되었다. ORF 1의 3'쪽에 위치한 ORF 3은 NCBI blast 결과 *Vibrio parahaemolyticus* RIMD chromosome 2 (NCBI access No. BA000032)에서 보고된 prolyl endopetidase와 80%의 유사성을 지니는 것을 확인 하였고 따라서 이 실험에서 확인된 β -lactamase는 chromosome에 위치한 것으로 추측된다. 3개의 ORF 중 β -lactamase, prolyl endopetidase를 제외한 1개의 ORF는 NCBI에서 blast 결

과 유사한 gene을 확인 할 수 없었다.

MIC 값 측정에서는 wild type의 경우 penicillin 계열과 cephalosporins 1세대, 2세대 모두에서 내성을 나타내고 있지만 transformant의 경우는 peincillin 계열에서만 내성을 나타내고 있음을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

- Ambler R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 289, 321-331.
- 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.
- Mabiat, C., and S. Goussard. (1993). PCR detection and identification of genes for extended-spectrum β -lactamases, p.553-559. In D.H. Persing (ed.), *Diagnostic molecular microbiology principles and application*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ottaviani D., Bacchiocchi I., Masini L., Leoni F., Carraturo A., Giammarioli M., Sbaraglia G. (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 18, 135-140.
- Teo J. W., Suwanto A., Poh C. L. (2000). Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44, 1309-1314.
- Shu-Fen Weng, Yuh-Fen Chao, and Juey-Wen Lin. (2004). Identification and characteristic analysis of the ampC gene encoding β -lactamase from *Vibrio fischeri*. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications.*, 314, 838-843.
- Zanetti S., Spanu T., Deriu A., Romano L., Sechi L. A., Fadda G., (2001). *In vitro* susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 17, 407-409.
- 김은희. (1999). 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성 전달성 R plasmid. *한국어병학회지*, 제 12 권, 115-122.
- 김재훈, 전려진, 박신후, 최동림, 김명석, 김진우, 정현도. (2005). Identification and characteristic analysis of the new β -lactamase encoding from *Vibrio alginolyticus* in Korea. 2005년도 추계 한국어병학회 학술발표회 발표요지집, 46-48.