

*Staphylococcus epidermidis*의 Tetracycline내성 Plasmid의 분석 및 Conjugation에 의한 내성전달*

영남대학교 의과대학 미생물학교실

정재규 · 박미경 · 김성광

= Abstract =

Analysis of Tetracycline Resistance Plasmids and the Conjugative Transfer of Tetracycline Resistancy in *Staphylococcus epidermidis*

Jae Kyu Chung, Mi Kyung Park and Sung Kwang Kim

Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea

When tetracycline resistancy were cured by ethidium bromide treatment, some of the cured strains lost the tetracycline resistance plasmid while other strains kept the plasmids.

Both strains of lost and remained plasmids were digested with restriction endonuclease Hind III and these cleaved plasmids were compared with that of parent strains, two plasmid remained strains showed same cleavage patterns between parent and cured strains, however, one plasmid lost strain showed dissimilarity with parent strain, but in the other one strain, among 4 plasmid lost colonies, 2 showed same but other 2 showed different patterns compared to parent strain.

Tetracycline was transferred by conjugation in on set(*Staphylococcus aureus* donor versus *Staphylococcus epidermidis*, recipient) with relative high frequency but the other 2 sets showed a low degree of frequency and the other 2 sets exhibited no transfer.

Key Words: Tetracycline, Plasmid, Conjugation

서 론

저자등¹⁾은 전보에서 *Staphylococcus epidermidis*의 tetracyclin(Tc)내성과 plasmid profile에 관하여 보고하였으며, Tc내성주는 2.9Mdal의 plasmid를 가진 균주와 이보다 약간 molecular weight가 적은 균주군으로 구분되었으며, 또 내성주의 curing으로 내성탈락과 plasmid 탈락이 반드시 일치하지 않음을 관찰하였다. Groves 등²⁾은 Tc내성 *Staphylococcus aureus*와 *S. epidermidis*는 molecular size가 같은 plasmid를 가졌다고 하였으며, restriction endonuclease (R-enzyme)로 digest하여 관찰하면 양균종의 plasmid가 고도의 동일성을 나타냄을 알 수 있었다. Cooksey 등³⁾도 *St. aureus*와 *St. epidermidis*에도 Tc내성균은 2.7Mdal의 plasmid를 가지고

있으며, cure에 의하여 Tc내성이 소실되면 plasmid도 같이 탈락함을 관찰하고 2.7Mdal의 plasmid가 Tc내성을 지배하는 인자임을 강력히 시사하였다.

저자들은 전보¹⁾의 실험성적을 일층 명백히 하기 위하여 Tc내성주를 cure하고 얻어진 cure주로서 plasmid의 소실여부와 잔존한 plasmid를 R-enzyme로 digest하며, plasmid의 cleavage를 관찰하며, 그 성상을 검토하였다. 아울러 균주간 conjugation에 의하여 Tc의 내성이 전달되는지를 관찰하였다. 약재내성 전달에 있어 *Staphylococcus* 균주 및 균종간 conjugation에 의한 전달이 많이 보고되고 있으며, 약제별로는 aminoglycoside에 대한 많은 보고를 볼 수 있다⁴⁻⁶⁾.

재료 및 방법

사용균주

Tc cured균주는 *St. epidermidis* 4주로부터 ethi-

*이 연구는 1986년도 영남대학교 기초의학연구회의 연구비 보조에 의하여 이루어졌음.

dium bromide 처리로서 얻어진 균주였으며, Table 1 과 같다. 균주 S₉에서 cured주 3주, 균주 S₂₂에서 cured주 1주, 균주 S₁₀에서 cured주 5주였으며, 이들 3주는 plasmid의 molecular weight가 2.9Mdal보다 약간 적은 균주이다. 그리고 molecular weight가 2.9Mdal인 균주 S₁₀에서 얻은 많은 Tc cured주중 7주를 택하여 실험하였다. Cured주는 Tc만 cure되고 phenotypic resistant marker는 모두 다같이 CM, EM을 가졌다. 그리고 plasmid 유무를 보면 균주 C₇₂, C₈, C₁₀ 및 C₁₁이 plasmid가 소

실되었다.

Conjugation에 사용한 균주는 Table 2와 같다. *St. epidermidis* 5주, *St. aureus* 1주를 사용하였으며, *St. epidermidis*중 recipient로 C₄₃, C₃₃ 사용한 주는 ethidium bromide로 cure시킨 균주였으며, Donor의 marker는 모두 GM, Tc, Km resistant한 균주였다.

Table 1. Tetracycline cured strains of *Staphylococcus epidermidis* used for plasmid analysis

Strains	Phenotype (resistant)			Plasmid
S ₉	CM*	GM	TC	+
C ₁	CM	GM		+
C ₄	CM	GM		+
C ₆	CM	GM		+
S ₂₂	CM	GM	TC	+
C ₇₂	CM	GM		-
S ₁₀	CM	GM	TC	+
C ₈	CM	GM		-
C ₉	CM	GM		+
C ₁₀	CM	GM		-
C ₁₁	CM	GM		-
C ₁₂	CM	GM		-
S ₁₆	CM	EM	TC	+
C ₄₂	CM	EM		+
C ₄₈	CM	EM		+
C ₄₉	CM	EM		+
C ₅₅	CM	EM		+
C ₅₆	CM	EM		+
C ₆₃	CM	EM		+
C ₆₇	CM	EM		+

*CM; chloramphenicol, GM; gentamicin, EM; erythromycin, TC; tetracycline

Restriction endonuclease에 의한 plasmid digestion

멸균된 Eppendorf tube에 미리 추출하여둔 plasmid DNA와 멸균 H₂O를 적당한 비율로 혼합하여 18μl가 되게 한다음 각 사용효소에 해당하는 10× digestion buffer를 2.0μl 주입하여 잘 혼합하고, 5 unit의 restriction enzyme을 넣고 완전히 혼합한 다음 각 효소가 요구하는 온도에서 2시간 정치, 반응시켰다. Digestion pattern의 관찰을 위해 적당량을 취해 1% agarose gel 상에서 전기 영동하였다. 사용한 효소는 Hind III, Eco RI, 및 Ban HI였다.

Conjugation procedure

내성 marker의 전달성은 Forbes 등⁷⁾의 방법에 준하여 filter mating법으로 조사하였다. Donor 균주와 recipient균주 각각을 4ml의 brain-heart infusion (BHI) broth에서 16시간 배양하여 donor균 배양액 1ml와 recipient균 배양액 3ml를 취하여 섞고 nitrocellulose filter(Millipore Co. HA, 0.45μm)를 통과시킨 다음 filter의 세균세포가 노출된 면을 배지 표면과 접촉되도록 BHI agar배지상에 놓은 다음 37°C에서 4시간 배양한 후 filter는 제거하고 1ml BHI broth로 혼합하여 그 mating mixtures를 적절한 선택항생제가 함유된 배지에 도포하여 48시간 배양후 발육집락을 관찰하고 내성 전달빈도를 계산하였다. 이때 반드시 donor cell과 recipient cell 대조균을 각각 선택배지에 도말 확인하였다.

$$\text{(Transfer frequency} = \frac{\text{No. of transconjugants}}{\text{No. of recipient cells}})$$

Table 2. Strain designation and phenotype

Strains	Species	Phenotypes(resistant)	Donor or recipient
C ₄₃	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	EM*	Recipient
C ₃₃	"	CM, EM	Recipient
S ₁₂	"	GM, TC, KM	Donor
S ₁₅	"	EM	Recipient
S ₂₃	"	GM, TC, KM	Donor
A ₁	<i>Staphylococcus aureus</i>	GM, TC, KM	Donor

*EM; erythromycin, CM; chloramphenicol, GM; gentamicin, TC; tetracycline, KM; kanamycin.

Fig. 1. Restriction endonuclease Hind III digested plasmids of Tc cured strain S_9 of *Staphylococcus epidermidis*. 1; strain S_9 , 2, 3 and 4; Tc cured strains of S_9 , M; λ -Hind III, a; Hind III digested strain S_9 , b, c and d; Hind III digested Tc cured strain of S_9 .

Fig. 2. Restriction endonuclease Hind III digested plasmid of Tc cured strain S_{23} of *Staphylococcus epidermidis*. 1; strain S_{23} , 2; Tc cured strain of S_{23} , a; Hind III digested strain S_{23} , b; Hind III digested Tc cured strain S_{23} , M₁; p^{BR322}-Alu I, M; λ -Hind III.

성 적

균주 S_9 및 cured 주의 plasmids 의 profile 및 Hind III digest 한 plasmid 의 cleavage 는 Fig. 1 과 같다. Cured 주는 Tc 는 탈락되었으나, plasmid 는 잔

Fig. 3. Restriction endonuclease Hind III digested plasmids of Tc cured strain S_{10} of *Staphylococcus epidermidis*. 1; strain S_{10} , 2, 3, 4, 5 and 6; Tc cured strains S_{10} , a; Hind III digested strain S_{10} , b, c, d, e and f; Hind III digested Tc cured strain S_{10} , M; λ -Hind III, M₁; p^{BR322}-Alu I.

Fig. 4. Restriction endonuclease Hind III digested plasmids of Tc cured strain S_{16} of *Staphylococcus epidermidis*. 1; strain S_{16} , 2, 3, 5, 6, 7 and 8; Tc cured strains S_{16} , a; Hind III digested strain S_{16} , b, c, d, e, f, g and h; Hind III digested Tc cured strain S_{16} , M; λ -Hind III.

류하였으며, 다시 이 band 를 Hind III 로 digest 하여도 cleavage 에 변동이 없었다. 균주 S_{23} 은 Tc cure 된 colony 한 개를 얻어서 plasmid 를 분석해 본 결과 Fig. 2 와 같으며, cured 주는 plasmid 가 소실 되어 있었다. 그러나 이들 plasmid 를 Hind III 로 digest 해본 결과 cured 주에 세로 cleavage 가 나타나 그 양상이 parent 주와 상이하였다. 따라서 Tc cure 에 수반하여 Tc 를 지배하는 plasmid 외에 것이 enzyme 에 의해서 digest 된 것 같다. 균주 S_{10} 의 Tc cure 주 5 주의 plasmid 를 관찰한 결과 Fig. 3 와 같이 5 주 중 1 주만 plasmid 가 잔류하고 나머지 4 주

Table 3. Tetracycline transfer by conjugation

Donor	Recipient	Selective donor marker	Transfer frequency
S ₂₃	S ₁₅	GM	6.1×10 ⁻⁸
		TC	6.0×10 ⁻⁸
		KM	7.4×10 ⁻⁸
S ₁₂	S ₁₅	GM	5.3×10 ⁻¹⁰
		TC	1.1×10 ⁻¹⁰
		KM	2.1×10 ⁻¹⁰
A ₁	C ₁₁	GM	6.6×10 ⁻⁷
		TC	2.0×10 ⁻⁷
		KM	2.0×10 ⁻⁸
A ₁	C ₃₃	GM	≤1×10 ⁻¹⁰
		TC	≤1×10 ⁻¹⁰
		KM	≤1×10 ⁻¹⁰
S ₂₃	C ₁₁	GM	≤1×10 ⁻¹⁰
		TC	≤1×10 ⁻¹⁰
		KM	≤1×10 ⁻¹⁰

GM; gentamicin, TC; tetracycline, KM; kanamycin

는 소실되었다. 이들 plasmid를 Hind III로 digest 하여본 결과 5주중 1주는 plasmid가 소실되고 나머지 3주는 cleavage가 S₁₀의 parent주와 같이 잔류하고 1주는 cleavage pattern이 parent주와 상이한 상태를 나타내었다.

Fig. 4는 균주 S₁₄의 Tc cured주의 plasmid profile이며, 이 균주에서 많은 Tc cured주를 얻었으며, 그중 plasmid가 잔류한 일부주에 대해서 검토하였다. 또 이 주는 plasmid의 molecular weight가 2.9M dal인 균주이다. Table에서 보는 바와 같이 parent주나 cured주간에 plasmid band에 차이가 없으며, 또 Hind III digest한 plasmid의 cleavage에도 차이점을 발견할 수 없다.

Conjugation에 의한 Tc의 전달상을 표시하면 Table 3과 같다. *St. epidermidis*간에 내성전달상은 S₂₃와 S₁₅사이에서 GM, TC, KM 모두 같은 빈도로 내성이 전달되며, 전반적으로 빈도가 낮았다. 그리고 S₁₂와 S₁₅주 사이에서도 3종약제에 대해서 같은 빈도로 내성이 전달되었으나 그 빈도는 매우 낮았다.

St. aureus A₁와 *St. epidermidis* cured주 C₁₁사이에서는 3종 약제에 대해서 비교적 빈도가 높게 내성이 전달되었다. 그러나 A₁주와 *St. epidermidis* cured주 C₃₃사이 그리고 S₂₃와 C₁₁사이에서는 conjugation에 의하여 약제내성이 전달되지 않았다.

고 찰

Tetracycline 내성을 지배하는 plasmid는 *Staphylococcus aureus*와 *St. epidermidis*간에 그 성상이 같음을 Groves⁹⁾ 등이 보고하였으며, Cooksey 등¹⁰⁾은 molecular weight까지 지적하였으며, Tc 내성소실과 plasmid소실이 일치함을 말하고 있다. 한편 Sjostrom 등¹¹⁾은 *St. aureus*와 *St. epidermidis*에서 분리한 Tc 및 chloramphenicol 내성 plasmid는 그 구조가 같다 하였으며, Iordanescu 등¹²⁾도 *St. aureus*와 *St. epidermidis*에서 분리한 Tc 내성 plasmid는 동일하다 하였다.

저자등¹³⁾의 성적에서 *St. epidermidis*의 Tc 내성 plasmid는 molecular weight가 2.9Mdal와 이보다 약간 적은 균주에서 나누어졌으며, Tc cure에 의하여 plasmid가 전주에서 소실되지 않았다. 그래서 Tc cure된 주에서 plasmid가 남아 있는 균주에 대해서 그 plasmid를 Hind III로 digest하여 관찰하였다. Groves 등⁹⁾의 R-enzyme cleavage pattern에 있어 Tc 내성과 plasmid pattern이 일치한다고 하였으나, 저자의 성적으로는 그러하지 못하였으며, 오히려 반대로 plasmid 소실된 cure주 중에서 Hind III digest로 cleavage band가 나타났다. 이는 아마 균주별 plasmid가 여러개 있으며, 그중에는 Tc 내성과 관계없는 plasmid가 digest된 까닭으로 사료된다. 어떤 예에서는 cleavage pattern이 parent와 상이하므로 일층 더 이런 생각을 뒷받침 해준다. 그러므로 R-enzyme digestion은 Tc 내성 plasmid의 성상을 규명하는데 큰 도움이 되지 못할지 모른다.

Conjugation에 의한 Tc 내성전달 실험에서 5set

의 conjugation에서 3예에서 내성전달을 볼 수 있었다. Recipient로 사용한 C₄주는 cured strain였으며, *St. aureus*과 recipient는 *St. epidermidis*이다. 여기서는 비교적 빈도가 높게 내성이 전달되었으나, 다른 2예에서는 빈도가 낮으며, 나머지 2예에서는 내성전달이 되지않았다. Donor의 marker가 단순하여 전달의 광범위한 양상을 볼 수 없었다. Tc전달은 일반적으로 잘되지 않으며, Schaberg 등¹⁰⁾도 GM, EM만 전달되고 Tc는 전달되지 않았다 하였다. McDonnell¹¹⁾등도 Tc단독전달은 되지않으며, GM전달때 Co-transfer되어 Tc도 mobilize 된다 하였다. 그러므로 Tc내성전달이 Co-transfer인지 그의 transduction 혹은 transformation mechanism여부를 검토해야만 conjugation process에 의한 Tc내성전달을 규명할 수 있을 것으로 사료된다. *St. epidermidis*의 내성전달은 GM을 중심으로 한 conjugation에 널리 알려져 있으며, 또한 detectable plasmid DNA없이 *St. epidermidis*에서 약제내성 전달이 conjugation process에 의해서 이루어진다고 최근 보고되고 있다¹¹⁾.

결 론

*St. epidermidis*의 tetracyclin내성이 ethidium bromide 처리로 cure 될 때 plasmid가 소실되는 경우와 잔류하는 예가 있었다. Plasmid가 잔류하는 경우 restriction endonuclease(Hind III)로 digest하여 plasmid의 성상을 검토하였든 바 4주에서 유래된 cured 주는 대부분이 parent 주와 plasmid의 cleavage pattern이 같으나, 그중 2주(S₁₀와 S₂₃)는 일부 cured 주의 cleavage pattern이 상이하였다.

Conjugation에 의한 tetracyclin의 내성전달은 *St. aureus*를 donor로 하고 *St. epidermidis*를 recipient로한 일례에서는 비교적 고율의 내성전달이 일어났으나 타 2개의 conjugation set에서는 그 빈도가 낮으며, 나머지 2set에서는 내성전달이 일어나지 않았다.

참 고 문 헌

- 1) 정재규, 김성광, 박미경, 김희선 : *Staphylococcus epidermidis*의 성상과 plasmid profile의 상관에 대해서. 대한화학요법지, 4:26, 1986.
- 2) Groves DJ: Interspecific relationships of antibiotic resistance in *Staphylococcus epidermidis*. Isolation and comparison of plasmid de-

termining tetracycline resistance in *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Can. J. Microbio.* 25:1468, 1979.

- 3) Cooksey RC and Baldwin IN: Relatedness of tetracycline resistance plasmid among species of coagulase negative *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemath*, 27:234, 1985.
- 4) Gaffe HW, Sweeney HM, Nathan C, Weinstein RA, Kabins SA and Cohen S: Identity and interspecific transfer of gentamicin resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* and *staphylococcus epidermidis*. *J. Inf. Dis.*, 141: 738, 1980.
- 5) Schaberg D, Chewell DB and Glatzer L: Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemoth*, 22:204, 1982.
- 6) McDonnell RW, Sweeney HM and Cohen S: Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents. Chemath*, 23: 151, 1983.
- 7) Farbes BA and Schaberg D: Transfer of resistance plasmid from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*; evidence for conjugation exchange of resistance. *J. Bact.* 153:627, 1983.
- 8) Sjorstrom LE, Lofdahl S and Philipson L: Transformation of *Staphylococcus aureus* by heterogeneous plasmids. *Plasmid*, 2:529, 1979, .
- 9) Iordanescu S, Surdeanu M, Dellalatta P and Nouick R: Incompatibility and molecular relationship between small *Staphylococcal* plasmids carrying the same resistance marker. *Plasmid*, 1: 468, 1978.
- 10) Schabery D, Power G, Betzold I and Forbes A: Conjugation R plasmids in antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infections. *J. Inf. Dis.*, 152:43, 1985.
- 11) Solh NE, Allignet I, Bismuth R and Buret B: Conjugative transfer of *Staphylococcal* antibiotic resistance markers in the absense of detectable plasmid DNA. *Antimicrob. Agents Chemoth*, 30:161, 1986.