

황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정

김기현 · 김종명 · 문경호*

경성대학교 약학대학

(Received March 28, 1992)

Characterization of Tetracycline Resistant Plasmid in *Staphylococcus aureus* by Restriction Enzyme Mapping

Ki Hyun Kim, Jong Myung Kim and Kyung Ho Moon*

College of Pharmacy, Kyungsunng University, Daeyun-dong 110-1, Nam-ku, Pusan 608-736, Korea

Abstract—The clinical isolate *Staphylococcus aureus* SA8 was resistant to tetracycline(Tc) and harboured a plasmid pKH1(24.82 kb). pKH1 was shown by curing and by transformation to specify resistance to Tc. The cleavage map of a pKH1 was determined by restriction enzyme mapping techniques. Cleavage map is given for *Bgl*II, *Eco*RI, *Hpa*II, *Pvu*II and *Sal*I. Restriction endonuclease *Bam*HI, *Bgl*I, *Bst*EII, *Hpa*I, *Pst*I, and *Xho*I have no sites on this plasmid. *Hae*III, *Xba*I, and *Hind*III have 5, 6, 14 sites, respectively.

Keywords □ *Staphylococcus aureus*, curing, transformation, tetracycline resistance plasmid, restriction map.

테트라사이클린(이하 Tc) 계열의 항생제들은 proton motive force에 의하여 세균의 세포질막안으로 수송되어¹⁾ 30S ribosomal subunit와 결합하며 이 결합은 aminoacyl-transfer RNA의 ribosome 수용체와의 결합을 입체적으로 방해한다. 이 결과로 인한 단백질 합성의 방해가 정균작용을 나타낸다고 알려져 있다.²⁾

병원성 세균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 경우 Tc 내성균이 발견되었으며 내성기전은 세포안으로의 수송기능 저하^{3,4)}와 특별한 efflux mechanism의 존재로 설명된다.⁵⁾ 이러한 내성에는 서로 구조가 유사한 몇가지의 플라스미드들이 관련되어 있는데 모두 Inc3 incompatibility계열에 속해있다.⁶⁾ 위의 플라스미드들은 크기가 4.0~4.5 kb이며 세포당 copy number가 20~50 개인 multicopy 플라스미드이다.⁷⁾ 세균의 염색체에 의한 Tc 내성도 발견되었으

며⁸⁾ 이러한 경우 염색체에 병합되어 있는 플라스미드는 Inc3계열의 플라스미드와 상당한 homology가 있음이 밝혀졌다.⁹⁾

한편 저자 등은 부산 지방에서 분리한 항생제 내성 황색포도상구균¹⁰⁾의 플라스미드를 조사하였으며 그 중에서 Tc 내성 균주인 *S. aureus* SA8에 하나의 플라스미드가 있음을 확인하고 curing 및 형질전환 실험을 통하여 그 플라스미드가 Tc 내성에 관련되어 있음을 알았으며, 또한 여러가지 제한 효소를 사용하여 restriction map을 작성하였으므로 이에 보고하는 바이다.

실험방법

실험균주—형질 전환을 위한 수여 균주로는 restriction system이 결손된 *S. aureus* RN4220(NCTC8325의 mutant)을 Dyke(Oxford Univ., U.K.)로부터 분양 받아 사용하였으며¹¹⁾ Tc 내성 균주로는 본 실험실에

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

서 임상 환자로부터 분리한 *S. aureus* SA8¹⁰을 사용하였다.

제한효소—Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다.

플라스미드 분리—Alkaline lysis method¹²⁾를 기본으로 하였으며 세포벽 분해 시에 lysozyme(10 mg/ml) 외에 lysostaphin을 최종 농도가 250 µg/ml 되도록 첨가하여 사용하였다.

Curing—여러 농도의 EtBr을 함유한 LB 배지에 *S. aureus* SA8을 접종하고 48시간 배양한 후 Tc가 함유되어 있지 않은 LB agar에 도말하여 colony를 얻고 이 colony들을 Tc(16 µg/ml)함유 LB agar에 다시 접종하여 curing여부를 확인하였다.

형질전환—Chang and Cohen의 방법¹³⁾을 변형하여 사용하였다. *S. aureus* RN4220을 10 ml LB에 접종하고 하룻밤 동안 배양한 다음 원심분리(2분, 10000 rpm)하여 얻은 pellet을 lysozyme(10 mg/ml)과 lysostaphin(150 µg/ml)이 함유된 HBM(0.7 M sucrose, 0.02 M maleic acid, 0.02 M MgCl₂, 60 g/L TSB(Tryptic soy broth, pH 7.5) 10 ml에 현탁시키고 37°C에서 2~3시간 방치하였다. 원심분리(5분, 5000 rpm)하여 cell debris를 제거하고, 상등액을 다시 원심분리(10분, 4°C, 16000 rpm)하여 protoplast pellet을 얻었다. 이 pellet을 200 µl HBM에 현탁시키고 20 µl 2 × HB, 20 µl DNA(1~10 µg), 1.8 ml 40% PEG 6000을 각각 가하여 상온에서 2분 동안 방치하였다. 10 ml HBM을 가하여 PEG 용액을 희석시키고 원심분리(30분, 4°C, 19000 rpm)하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 0.4 ml HBM에 현탁시키고 100 µl 씩 DM3 재생 배지에 도말하여 37°C에서 3시간 동안 preincubation시켰다. Tc(16 µg/ml)를 포함하는 HB/TSB(2 × TSA(Tryptic soy broth agar)와 2 × HB를 동량 섞은 배지) 5 ml을 preincubation 시킨 배지 위에 부어 굳히고 37°C에서 2~3일간 배양하였다. 성장한 colony를 Tc(16 µg/ml)가 포함된 LB 배지에 접종하여 배양한 다음 플라스미드를 분리 확인하였다.

제한효소처리 및 전기영동—*Bam*HI, *Bgl*I, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I을 사용하여 플라스미드 digestion을 실시하였다. 제한효소 mapping을 위해서는 double digestion을 실시하였다. DNA 조각들의 크기는 0.5~1.0% agarose gel electrophoresis를 하여



Fig. 1—Agarose gel electrophoresis of rapidly isolated *S. aureus* plasmid. Lane 1, *S. aureus* RN4220; lane 2, *S. aureus* SA8; lane 3, *S. aureus* KH1; lane 4, a derivative of *S. aureus* SA8 cured of tetracycline resistance.

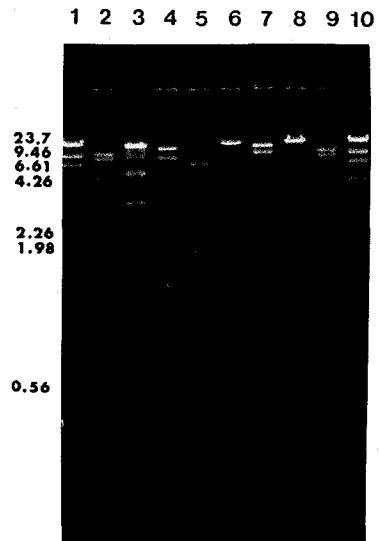


Fig. 2—Agarose gel electrophoresis of pKHI cleaved with the restriction endonucleasases. Lane 2, *Bgl*II; lane 3, *Eco*RI; lane 4, *Hae*III; lane 5, *Hind*III; lane 6, *Hpa*II; lane 7, *Pvu*II; lane 8, *Sal*I; lane 9, *Xba*I; lane 1 and 10, lambda DNA cleaved with *Hind*III; fragment sizes(in kb) are shown at left of gel.

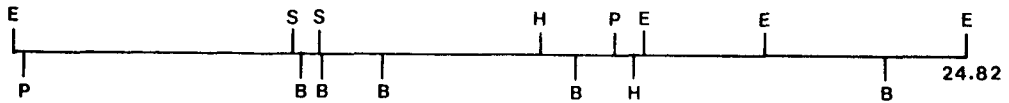


Fig. 3—Restriction endonuclease map of pKH1. Restriction sites are indicated by B(*Bgl*II), E(*Eco*RI), H(*Hpa*II), P(*Pvu*II), and S(*Sal*I). Map coordinate is expressed in kilobases.

결정하였으며 이때 전압은 2~5 V/cm로하였고 완충 용액은 TBE(pH 7.5~7.8, 89 mM Tris-borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)를 사용하였다. EtBr로 염색하여 관찰하고 polaloid type 667 film을 사용하여 사진을 찍었다. 전기 영동 시에 molecular marker로는 *Hind*III-digested λ DNA, *Eco*RI-digested λ DNA, *Hind*III/*Eco*RI-double digested λ DNA를 사용하였다.

결 과

플라스미드—Tc 내성을 가지고 있는 *S. aureus* SA8로부터 alkaline lysis method에 의하여 플라스미드를 분리하여 전기영동한 결과가 Fig. 1에 나와 있다. *S. aureus* SA8은 한개의 플라스미드를 가지고 있음이 확인되었으며 이 플라스미드를 pKH1이라 명명하였다.

Curing—EtBr이 15 µg/ml 들어 있는 LB 배지에서 성장한 *S. aureus* 배양약을 Tc가 함유되어 있지 않은 LB agar에 도말한 후 37°C에서 배양하여 colony를 얻었다. 이 colony들을 Tc가 16 µg/ml 농도로 함유된 LB agar에 다시 접종 하여 배양한 다음 성장하지 못한 colony들을 curing된 것으로 생각하였다. 이 colony들의 플라스미드를 분리한 결과 Fig. 1와 같이 *S. aureus* SA8의 플라스미드가 없어진 것을 확인하였다. 또한 curing된 균주의 MIC는 0.5 µg/ml 이하로 나타났다.

형질전환—*S. aureus* SA8에서 분리한 플라스미드를 가지고 플라스미드도 없고 내성도 가지고 있지 않은 *S. aureus* RN4220을 형질 전환시켰다. Tc를 16 µg/ml 함유한 배지에서 성장한 colony에서 플라스미드를 분리하여 전기영동한 결과가 Fig. 1에 나와 있다. *S. aureus* RN4220에서 볼 수 없었던 플라스미드를 확인 할 수 있었으며 *S. aureus* SA8의 플라스미드와도 동일하였다. 이 *S. aureus* RN4220 형질 전환체를 *S. aureus* KH1이라 명명하였다.

제한효소의 처리—pKH1을 *Bgl*II, *Eco*RI, *Hae*III,

Table I—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced when subjecting pKH1 DNA to various restriction endonuclease

<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hpa</i> II	<i>Pvu</i> II	<i>Sal</i> I
9.56	16.52	22.34	15.34	24.18
8.00	5.20	2.48	9.48	0.64
5.13	3.10			
1.51				
0.62				
24.82				

*Hind*III, *Hpa*II, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I으로 처리한 후 전기영동한 것이 Fig. 2에 나와 있다. *Bgl*II와 *Hae*III의 경우 5개의 제한효소부위를 가지고 있었으며 *Eco*RI은 3개, *Hpa*II와 *Pvu*II는 2개, *Sal*I은 1개, *Xba*I은 6개의 부위를, 그리고 *Hind*III는 적어도 14개 부위를 가지고 있었다. 그 밖에 *Bam*HI, *Bgl*I, *Bst*EII, *Hpa*I, 그리고 *Xho*I은 제한효소부위가 없었다(자료사진 생략).

각 조각들의 크기는 λ DNA를 *Hind*III로 처리한 것의 조각들의 크기와 비교하여 결정하였으며 그 결과는 Table I에 나와 있다. 위의 제한 효소 중에서 *Bgl*II, *Eco*RI, *Hpa*II, *Pvu*II, *Sal*I의 restriction map을 작성하기 위하여 여러 조합의 double digestion을 실시하였으며 큰 조각들의 크기를 결정하기 위하여는 0.5% agarose gel electrophoresis를, 작은 조각들의 크기를 결정하기 위하여서는 1.0% agarose gel electrophoresis를 하였다. 그 결과 얻어진 값 들이 Table II에 나와 있으며 pKH1의 크기는 약 24.82 kb로 계산되었다.

고 찰

테트라사이클린(Tc) 내성을 가지고 있는 *S. aureus* SA8의 플라스미드 pKH1은 curing과 형질전환 실험을 통하여 테트라사이클린 내성을 매개함을 확인하였다. curing 결과 Tc에 대한 MIC 값이 64 µg/ml에서 0.5

Table II—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced by double digestion of μ KH1 plasmid

<i>Bgl</i> III+ <i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> III+ <i>Pvu</i> II	<i>Bgl</i> III+ <i>Sal</i> I	<i>Eco</i> RI+ <i>Hpa</i> II	<i>Eco</i> RI+ <i>Pvu</i> II	<i>Eco</i> RI+ <i>Sal</i> I	<i>Pvu</i> II+ <i>Hpa</i> II	<i>Sal</i> I+ <i>Hpa</i> II	<i>Pvu</i> II+ <i>Sal</i> I
7.51	7.16	9.40	13.79	15.34	8.53	13.44	15.90	9.48
5.13	7.08	8.00	5.20	5.20	7.35	8.90	5.80	7.70
3.15	5.13	5.13	3.10	3.10	5.20	1.90	2.48	7.00
3.10	2.40	1.51	2.48	0.83	3.10	0.58	0.64	0.64
2.05	1.51	0.48	0.25	0.35	0.64			
1.75	0.92	0.16						
1.51	0.62	0.14						
0.62								
24.82								

μ g/ml 이하로 떨어졌으며 형질전환 결과 Tc 내성이 없던 *S. aureus* RN4220이 내성을 갖게 되었다. μ KH1을 여러가지 제한효소로 처리하고 전기영동하여 크기를 구해본 결과 약 24.82 kb로 나타났다. 일반적으로 Tc 내성을 매개하는 플라스미드 들은 Inc3 incompatibility group에 속해있으며 크기가 4.0~4.5 kb인 것으로 알려져 있는데^{6,7)} 이에 비하여 보면 μ KH1은 다른 나라에서 발견되지 않은 플라스미드라고 생각되며 현재 Tc 내성 유전자를 찾기 위하여 cloning이 진행 중이므로 clonig 후 sequencing이 완결되면 더욱 더 정확한 비교가 이루어 질 것으로 사료된다.

문 헌

- McMurry, L.M, Cullinane, J.C., Petrucci, R.E. Jr. and Levy, S.B.: Active uptake of tetracycline by membrane vesicles from susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **20**, 307-313 (1981).
- Levy, S.B.: *Antimicrobial Drug Resistance*, Academic press, Inc., Orlando, p.191-240 (1984).
- Kuck, N.A. and Forbes, M.: Uptake of minocycline and tetracycline by tetracycline-susceptible and -resistant bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 662-664 (1973).
- Sompolinsky, D., Zaidenzaig, Y., Zeigler-Schlomowitz, R. and Abramoda, N.: Mechanism of tetracycline resistance in *S. aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **62**, 351-362 (1970).
- McMurry, L.M., Petrucci, R.E. Jr. and Levy, S.B.: Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 3974-3977 (1980).
- Iordanescu, S., Surdeanu, M., Della Latta, P. and Novick, R.: Incompatibility and molecular relationships between small staphylococcal plasmids carrying the same resistance marker. *Plasmid*, **1**, 468-479 (1978).
- Novick, R.P., Sanchez-Rivas, C., Gruss, A. and Edelmañ, I.: Involvement of the cell envelope in plasmid maintenance: plasmid curing during the regeneration of protoplasts. *Plasmid*, **3**, 348-358 (1980).
- Kayser, F.H., Wuest, J. and Corrodi, P.: Transduction and elimination of resistance determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2**, 217-223 (1972).
- Gillespie, M.T., May, J.W. and Skurray, R.A.: Detection of an integrated tetracycline-resistance plasmid in the chromosome of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 1723-1728 (1986).
- 강재선, 문경호 : 황색포도상구균의 항생제 내성 양상. *약학회지* **34**, 122 (1990).
- Kreiswirth, b., Lofdahl, S., Betlry, M., O'Reilly, M. and Schlievert, P.: The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by prophage. *Nature*, **305**, 709-712 (1983).
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Lab. 368 (1982).
- Chang, S. and Cohen, S.N.: High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111-115 (1979).