

황색포도상구균의 항생제 다제내성을 갖는 플라스미드의 동정

김기현 · 이대운 · 김종명 · 문경호*

경성대학교 약학대학

(Received September 14, 1992)

Characterization of Multidrug Resistant Plasmid of *Staphylococcus aureus*

Ki Hyun Kim, Dae Woon Lee, Jong Myung Kim and Kyung Ho Moon*

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

Abstract—The clinical isolate *Staphylococcus aureus* SA2 was resistant to ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, methicillin, streptomycin, and tobramycin and harboured more than two kinds of plasmids. Transformation experiment demonstrated that 40.98-kb plasmid(pKH2) encoded resistance to ampicillin, clindamycin, erythromycin, kanamycin, and streptomycin. The cleavage map of a pKH2 was determined by restriction enzyme mapping techniques. Cleavage map is given for *Bam*HI, *Bgl*I, *Bst*EII, *Sal*I and *Xho*I.

Keywords □ *Staphylococcus aureus*, protoplast transformation, ampicillin-clindamycin-erythromycin-kanamycin-streptomycin resistant plasmid, restriction map.

병원성 세균이 가지고 있는 플라스미드에 의한 항생제 내성 현상은 임상적으로나 경제적으로 전세계에 큰 문제를 주고 있다. 따라서 항생제 내성을 매개하는 플라스미드를 유전적으로 또는 생화학적으로 규명하기 위한 연구가 활발히 행해지고 있다.¹⁾ 플라스미드를 동정하기 위해서는 *in vitro*에서 플라스미드 전달을 이용한 방법이 주로 이용되는데 황색포도상구균의 경우에는 형질도입,²⁾ mixed culture transfer(=phage mediated conjugation,³⁾ 접합,⁴⁻⁷⁾ 형질전환⁸⁾ 등의 방법이 이용되고 있다. 저자 등은 임상에서 분리한 황색포도상구균에서 형질전환을 이용하여 Tc 내성을 매개하는 플라스미드를 동정하여 보고한 바 있는데⁹⁾ 본 논문에서는 앰피실린-클린다마이신-에리스로마이신-가나마이신-스트렙토마이신에 다제 내성을 갖게하는 플라스미드를 동정하였기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

항생제—Ampicillin(Am)은 영진약품, erythromycin(Em)과 streptomycin(Sm)은 종근당, chloramphenicol(Cm)은 한국그락소, clindamycin(Cl)은 한국업존, methicillin(Mc)은 대한약품공업, gentamicin(Gm)은 동신제약, kanamycin(Km)은 동아제약, tobramycin(Tm)은 대웅제약 제품을 시중에서 구입하여 사용하였으며 이 중 Em과 Cm은 ethanol로 추출하여 사용하였다.

배지—황색포도상구균의 배양에는 Tryptic soy broth(TSB)와 Tryptic soy agar(TSA)를 Difco에서 구입하여 사용하였으며 형질전환 시 재생배지로는 DM3 배지를 사용하였다. DM3 배지는 1 M sodium succinate(pH 7.3) 500 ml에 8g agar, 5g yeast extract, 5g casamino acids를 넣어 멸균한 것에 따로 멸균된 1 M MgCl₂ 20 ml, 20% glucose 25 ml, 5% bovine

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

serum albumin 2 ml, 3.5% K_2H phosphate + 1.5% KH_2 phosphate 100 ml을 가하여 만들었다.

실험균주—형질 전환을 위한 수여 균주로는 restriction system이 결손된 *S. aureus* RN4220(NCTC8325의 mutant)을 Dyke(Oxford Univ., U.K.)로부터 분양 받아 사용하였으며¹⁰⁾ 항생제 내성균주로는 Am, Cl, Cm, Em, Gm, Km, Mc, Sm, Tm에 다제내성을 갖는 *S. aureus* SA2¹¹⁾를 사용하였다.

제한효소—Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다.

플라스미드 분리—*S. aureus* SA2의 플라스미드 분리는 Alkaline lysis method¹²⁾를 기본으로 하였으며 세포벽 분해 시에 lysozyme(10 mg/ml)외에 lysostaphin의 최종 농도가 250 μ g/ml 되도록 첨가하여 사용하였다.

형질전환—Chang and Cohen의 방법¹³⁾을 변형하여 사용하였다. *S. aureus* RN4220을 10 ml TSB에 접종하고 하룻밤 동안 배양한 다음 원심분리(2분, 10000 rpm)하여 얻은 pellet을 lysozyme(10 mg/ml)과 lysostaphin(250 μ g/ml)이 함유된 HBM(0.7 M sucrose, 0.2M maleic acid, 0.02M $MgCl_2$, 60g/L TSB, pH 7.5) 10 ml에 현탁시키고 37°C에서 2~3시간 방치하였다. 원심분리(5분, 5000 rpm)하여 cell debris를 제거하고 상층액을 다시 원심분리(10분, 4°C, 16000 rpm)하여 protoplast pellet을 얻었다. 이 pellet을 200 μ l HBM에 현탁시키고 20 μ l 2×HB(1.4 M sucrose, 0.04 M $MgCl_2$, 0.04 M maleic acid, pH 6.5), 20 μ l 플라스미드(1~10 μ g), 1.8 ml 40% PEG 6000을 각각 가하여 상온에서 2분 동안 방치하였다. 10 ml HBM을 가하여 PEG 용액을 희석시키고 원심분리(30분, 4°C, 1900 rpm)하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 0.4 ml HBM에 현탁시키고 100 μ l DM3 agar에 도말하여 37°C에서 3시간 동안 preincubation시켰다. Em(50 μ g/ml)을 포함하는 HB/TSB(2×TSA와 2×HB를 동량 섞은 배지) 5 ml를 preincubation 시킨 배지 위에 부어 균히고 37°C에서 2~3일간 배양하였다. 성장한 colony를 Em (50 μ g/ml)이 포함된 TSB 배지에 접종하여 배양한 다음 플라스미드를 분리 확인하였다.

제한효소처리 및 전기영동—*Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*III, *Bst*EII, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*II, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I을 사용하여 single digestion을 실시하였으며 제한효소지도 작성에 적당한 효소를 선

별하여 double digestion을 실시하였다. DNA 조각들의 크기는 큰 조각의 경우에는 1.0% agarose gel electrophoresis를, 작은 조각의 경우에는 2.0% agarose gel electrophoresis하여 결정하였으며 이때 전압은 2~5 V/cm로하였고 완충용액은 TBE(pH 8.3, 89 mM Tris-borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)를 사용하였다. EtBr로 염색하여 관찰하고 polaloid type 667 film을 사용하여 사진을 찍었다. 전기영동 시에 molecular marker로는 *Hind*III-digested λ DNA, *Eco*RI-digested λ DNA, *Hind*III/*Eco*RI-double digested λ DNA를 사용하였으며 작은 조각의 길이 결정에는 *Hpa*I-digested λ DNA와 *Pvu*II-digested λ DNA를 사용하였다.

결 과

형질전환—항생제 다제내성을 갖고 있는 *S. aureus* SA2로부터 플라스미드를 분리하여 내성이 없는 *S. aureus* RN4220을 형질전환시키고 Em이 50 μ g/ml 들어 있는 배지에서 배양한 결과 Em 내성을 나타내는 *S. aureus* RN4220 형질전환체들을 얻을 수 있었으며 이 형질전환체들을 Em이 50 μ g/ml 들어있는 TSB배지에서 배양한 후 플라스미드를 분리하여 1% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 플라스미드 양상을 비교하였다(Fig. 1). *S. aureus* SA2의 플라스미드 중에서 가장 크기가 큰 플라스미드를 *S. aureus* RN4220 Em 내성 형질전환체에서 발견할 수 있었다. 형질전환을 통하여 얻어진 Em 내성 *S. aureus* RN4220 형질전환체를 *S. aureus* KH2, 그리고 이 균주가 가지고 있는 Em 내성 플라스미드를 pKH2라고 명명하였다. pKH2가 가지는 다른 내성을 확인하기 위하여 *S. aureus* KH2를 Am(10 μ g/ml), Cl(30 μ g/ml), Cm(40 μ g/ml), Gm(50 μ g/ml), Km(50 μ g/ml), Mc(40 μ g/ml), Sm(50 μ g/ml), Tm(40 μ g/ml)이 각각 함유된 TSB에서 배양한 결과 pKH2는 Em외에 Am, Cl, Km, Sm 내성을 매개함을 알 수 있었다.

제한효소의 처리—*S. aureus* KH2로부터 분리한 pKH2를 *Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*II, *Pvu*II, *Sal*I, *Xba*I, *Xho*I을 사용하여 single digestion을 한 후 전기영동을 실시하였다. *Bam*HI은 한개의 제한효소 부위를, *Bst*EII와 *Xho*I은 두개의 부위를, *Bgl*II은 세개의 부위를, *Sal*I은 4개의 부위를

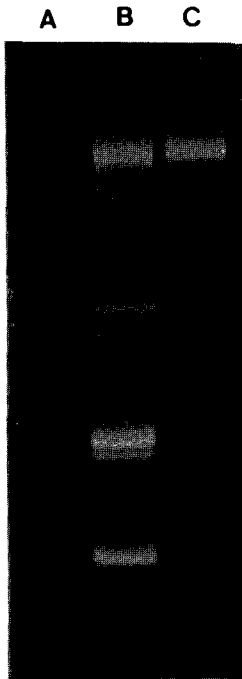


Fig. 1—Agarose gel electrophoresis of rapidly isolated *S. aureus* plasmid. Lane A, *S. aureus* RN4220; lane B, *S. aureus* SA2; lane C, *S. aureus* KH2.

각각 가지고 있었다(Fig. 2). Fig. 2에서 *Bgl*I은 두개의 band로 보이지만 크기가 큰 위의 band의 경우 크기가 다른 두개가 모여 있음이 double digestion 결과 확인되었다. 나머지 다른 제한효소의 경우들은 5개 이상의 부위를 가지고 있었다. 제한효소지도 작성을 위한 double digestion은 적은 제한효소 부위를 갖고 있는 *Bam*HI, *Bgl*I, *Bst*EII, *Sal*I, *Xho*I을 조합하여 실시하였다.

조각들의 길이 결정—single digestion과 double digestion을 실시하여 얻어진 조각들의 길이 결정은 λ DNA를 여러가지 제한효소로 처리하여 얻어진 molecular marker와 비교하여 구하였다. 적은 크기의 조각들의 길이를 먼저 구하였으며 크기가 커서 구하기 힘든 것들은 적은 것을 합하여 구하였다. 그 결과가 Table I과 Table II에 나와 있으며 pKH2의 길이는 40.98 kb로 계산되었다.

제한효소지도—Table I과 Table II의 값을 가지고 제한효소지도를 작성한 결과가 Fig. 3에 나와있다. *Sal*I의 경우 4개 조각들의 순서 결정에는 partial digestion이 이용되었다.



Fig. 2—Agarose gel electrophoresis of pKH2 cleaved with the restriction endonucleases. Lane A, *Bam*HI; lane B, *Bgl*I; lane C, *Bst*EII; lane D, *Sal*I; lane E, *Xho*I.

Table I—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced when subjecting pKH2 DNA to various restriction endonucleases

<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> I	<i>Bst</i> EII	<i>Sal</i> I	<i>Xho</i> I
40.98	22.55	35.07	23.31	29.45
	17.98	5.91	10.45	11.53
	0.45		4.37	
			2.85	
40.98				

고 찰

1960년대 초반에 포도상구균으로부터 플라스미드가 발견된 이후로 세가지 계열의 플라스미드들이 확인 동정되었다.¹⁴⁾ 처음 발견된 것들은 class II에 속하는 것들로서 중간 정도의 크기와 copy number를 가지고 있으며 β -lactamase와 무기 이온에 대한 내성을 가지고 있다.¹⁵⁾ class I 계열의 플라스미드는 그보다 약간 뒤에 발견되었는데 크기는 작고(1~5 kb) 많은 copy number(세포당 15~50개)를 가지고 있으며 보통 하나의 항생제에 대해서 내성을 나타낸다. 최근에는 class III 계열로서 길이가 40~60 kb이며 다제 내성을

Table II—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced by double digestion of pKH2 plasmid

<i>Bam</i> HI + <i>Bgl</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Bst</i> EII	<i>Bam</i> HI + <i>Sal</i> I	<i>Bam</i> HI + <i>Xho</i> I	<i>Bgl</i> I + <i>Bst</i> EII	<i>Bgl</i> I + <i>Sal</i> I	<i>Bgl</i> I + <i>Xho</i> I	<i>Bst</i> EII + <i>Sal</i> I	<i>Bst</i> EII + <i>Xho</i> I	<i>Sal</i> I + <i>Xho</i> I
22.55	26.35	23.31	27.20	17.98	15.53	17.98	16.10	28.60	16.95
17.58	8.72	7.40	11.53	8.32	7.80	11.53	10.45	6.47	9.65
0.45	5.91	4.37	2.25	8.32	7.33	9.17	5.91	5.06	6.36
0.40		3.05		5.91	4.37	1.85	4.37	0.85	4.37
		2.85		0.45	2.85	0.45	2.85		2.85
					2.65		1.30		0.80
					0.45				

40.98

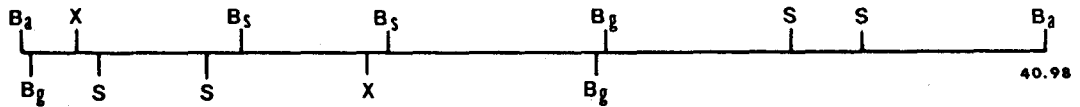


Fig. 3—Restriction endonuclease map of pKH2. Restriction sites are indicated by Ba(*Bam*HI), Bg(*Bgl*II), Bs(*Bst*EII), S(*Sal*I), and X(*Xho*I). Map coordinate is expressed in kilobases.

나타내는 플라스미드들이 발견되었는데 이들은 대부분 겐타마이신 내성을 가지고 있음이 보고되었다.^{16,17)} 한편 Grubb 등은 크기가 45~50 kb이며 Sm, Nm (neomycin), Km, Em, Sp(spectinomycin)에 내성을 나타내는 pWG14를 동정하여 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 이상의 결과를 종합하여 보면 본 실험실에서 *S. aureus* SA2로부터 분리 동정한 pKH2는 크기가 40.98 kb이고 Am, Cl, Em, Km, Sm에 다제내성을 나타내는 것으로 보아 class III 계열에 속하는 것으로 사려되지만 내성 양상은 지역적으로 약간의 차이가 있음을 알 수 있다. 외국의 경우를 보면 많은 항생제 내성 플라스미드들이 분리 확인되어 계통적으로 정리되고 있음으로 우리나라에서도 항생제 내성 현상이 심각한 황색포도상구균에 대한 플라스미드의 연구가 지속되어야 할 것으로 사려된다.

문 헌

- 1) Lyon, B. R. and Skurray, R.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiol. Rev.*, **51**(1), 88-134(1987).
- 2) Ritz, H. L. and Baldwin, J. N. Introduction of penicillinase production in staphylococci by bacteriophage. *Bacteriol Proc.*, **58**, 40(1958).
- 3) Lacey, R. W.: Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus*

- aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **119**, 423-435(1980).
- 4) Archer, G. L. and Johnston, J. L.: Self transmissible plasmids in staphylococci that encodes resistance to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24**, 70-77(1983).
- 5) Forber, B. S. and Schaberg, D. R.: Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J. Bacteriol.*, **153**, 627-634(1983).
- 6) McDonnel, R. W., Sweeney, H. M. and Cohen, S.: Conjugational transfer of gentamicin resistance plasmids intra- and interspecifically in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **23**, 151-160(1983).
- 7) Townsend, D. E., Bolton, S., Ashdown, N. and Grubb, W. B.: Transfer of plasmid-borne aminoglycoside-resistance determinants in staphylococci. *J. Med. Microbiol.*, **20**, 169-185(1985).
- 8) Murphy, E., Phillips, S., Edelman, I. and Novick, R. P.: Isolation and characterization of plasmid insertions. *Plasmid*, **5**, 292-305(1981).
- 9) 김기현, 김종명, 문경호 : 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. *약학회지*, **36**, 255-258(1992).
- 10) Kreiswirth, B. Lofdahl, S., Betley, M., O'Reilly, M. and Schlievert, P.: The toxic shock syndrome exo-

- toxin structural gene is not detectably transmitted by prophage. *Nature*, **305**, 709-712(1983).
- 11) 강재선, 문경호 : 황색포도상구균의 항생제 내성 양상. 약학회지, **34**, 122-125(1990).
 - 12) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sanbrook, J.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Lab., pp. 368-369 (1982).
 - 13) Chang, S. and Cohen, S. N.: High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111-115(1979).
 - 14) Novick, R. P.: Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, **43**, 537-565(1989).
 - 15) Shalita, Z., Murphy, E. and Novick, R. P.: Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: Structural and evolutionary relationships. *Plasmid*, **3**, 291-311 (1980).
 - 16) Gray, G. S.: Characterization of plasmids in aminocyclitol-resistant *Staphylococcus aureus*: Electron microscopic and restriction endonuclease analysis. *Plasmid*, **9**, 159-181(1983).
 - 17) Jaffe, H. W., Sweeney, H. M., Weinstein, R. A., Kabins, S. A., Nathan, C. and Cohen, S.: Structural and phenotypic varieties of gentamicin resistance plasmids in hospital strains of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **21**, 773-779(1982).
 - 18) Townsend, D. E., Ashdown, N., Annear, D. I. and Grubb, W. B.: A conjugative plasmid encoding production of a diffusible pigment and resistant to aminoglycosides and macrolides in *Staphylococcus aureus*. *Aust. J. Exp. Biol. Sci.*, **63**, 573-586(1985).