

클로람페니콜 내성 황색포도상구균의 플라스미드 동정

박정희 · 이재윤 · 문경호*

경성대학교 약학대학

(Received November 10, 2007; Revised December 13, 2007)

Characterization of Plasmids of Chloramphenicol Resistant *Staphylococcus aureus*

Jung Hee Park, Jae Yoon Lee and Kyung Ho Moon*

College of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

Abstract — *Staphylococcus aureus* KH13 and *Staphylococcus aureus* KH28 were resistant to chloramphenicol, ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tobramycin, and norfloxacin. A plasmid (pKH13) and two plasmids (pKH14, pKH15) were isolated from *Staphylococcus aureus* KH13 and *Staphylococcus aureus* KH28, respectively and complete nucleotide sequences of three plasmids were determined. It was found that pKH13 and pKH15 mediated chloramphenicol resistance and pKH14 was a cryptic plasmid.

Keywords □ chloramphenicol resistant plasmid, *Staphylococcus aureus*, multiple antibiotic resistance, cryptic plasmid

단백질 합성 과정에서 50S ribosomal subunit와 결합하여 transpeptidation 단계를 방해함으로써 정균작용을 일으키는 클로람페니콜(Cm)의¹⁾ 항생제 내성기전은 chloramphenicol acetyltransferase(CAT)의 작용에 의하여 acetyl coenzyme A와 반응하여 아세틸화됨으로써 불활성화 되기 때문이며 황색포도상구균의 경우 적어도 5 종류의 CAT이 있는 것으로 보고되었다.^{2,3)} 황색포도상구균의 Cm 내성은 크기가 2.9~5.1 kb의 multicopy 플라스미드에 의해서 매개되며^{4,8)} 이 플라스미드들은 DNA-DNA hybridization 혹은 restriction endonuclease 분석에 의해서 3 종류로 분류가 되며 각각의 prototype은 pC221, pC223, pC194로 알려져 있다.⁹⁾

현재 Cm은 황색포도상구균에 의한 감염의 경우 재생불량성빈혈 같은 심각한 부작용으로 인하여 그 사용이 제한되어 있어 Cm 내성균을 분리하기가 어려운 형편이다.¹⁰⁾ 저자 등은 1990년 부산 소재 병원에서 분리한 항생제 다제내성균 *S. aureus* SA2로부터 pC221 계열의 Cm 내성 플라스미드 pKH7을 분리 동정하여¹¹⁾ 염기서열을 보고하였다.^{12,13)} 본 논문에서는 2004년 분당제생병원에서 분리된 2종의 Cm 내성 *S. aureus*로부터 얻어진 3 종의 플라

스미드 전체염기서열을 결정하여 동정한 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

실험균주 및 플라스미드

분당제생병원에서 2004년 1월부터 6월 사이에 수집된 35종의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 균주 중에서 Cm 내성을 나타내는 *S. aureus* KH13과 *S. aureus* KH28을 사용하였으며, BAP의 배지에 균을 배양하여 그람염색으로 그람양성구균을 확인한 후 catalase, coagulase, DNase 시험 및 MSA 배지에서의 성장여부로 *S. aureus*임을 동정 확인하였다. 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 클로닝 균주로는 *E. coli* JM83(*ara*, $\Delta(lac, proA, B)$, *rps*, *strA*, *thi*, $\phi 80dlacZ$ *M15(rk+*, *mk+*))을 사용하였으며 Phagemid인 pBluescriptII KS⁺를 클로닝 및 염기서열 결정 벡터로 사용하였다.

시약 및 효소

Cm 내성과 다른 항생제에 대한 내성 양상을 조사하기 위하여 BD Diagnostic System에서 항생제 디스크를 구입하여 사용하였으며 각각 다음의 농도를 함유하고 있다. Ampicillin(Am), 10 μ g; cephalothin(Cf), 30 μ g; cefotaxime(Ct), 30 μ g; amoxicillin with clavulanic acid(Ac), 30 μ g; ampicillin with sulbactam(Sa), 20 μ g;

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-620-4804
(E-mail) khmun@ks.ac.kr

streptomycin(Sm), 10 µg; kanamycin(Km), 30 µg; gentamicin (Gm), 10 µg; tobramycin(Tm), 10 µg; amikacin(Ak), 30 µg; netilmicin(Nm), 30 µg; tetracycline(Tc), 30 µg; doxycycline (Dc), 30 µg; erythromycin(Em), 15 µg; clindamycin(Cl), 2 µg; chloramphenicol(Cm), 30 µg; norfloxacin(Nf), 10 µg; sulfamethoxazole with trimethoprim(St), 75 µg; rifampin(Rf), 5 µg; vancomycin(Va), 30 µg. 여러 가지 제한효소, T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 Wizard™ DNA purification systems을 Promega에서 구입하여 사용하였다.

MIC 결정

Cm에 대한 MIC는 고체배지계열희석법으로 결정하였다.

Plasmid 분리

*S. aureus*로부터 플라스미드의 분리는 김¹⁴⁾ 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다.¹⁵⁾

클로닝 및 염기서열결정

*S. aureus*로부터 분리된 플라스미드와 클로닝 벡터인 pBluescriptII KS⁺를 동일한 제한효소로 처리한 후 정제하고 T4 DNA ligase를 사용하여 연결한 다음 *E. coli* JM83에 CaCl₂법¹⁶⁾으로 형질전환시켜 염기서열결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 마크로젠에 의뢰하여 수행하였다.

염기서열 분석

염기서열을 결정한 다음 염기서열 및 ORF 분석은 NCBI의 BLAST를 이용하여 수행하였다.¹⁷⁾

실험 결과

Cm 내성 균주

분당제생병원에서 분양받은 35종의 *S. aureus*를 대상으로 Cm에 대한 내성양상을 항생제 디스크 법으로 검색한 결과 *S. aureus* KH13과 *S. aureus* KH28에서 Cm 내성을 확인하였으며 MIC를 측정할 결과 두 균주 모두 126 µg/ml로 나타났다. 이 두 균주는 Cm 외에도 Am, Cl, Em, Gm, Km, Sm, Tm 그리고 Nf에 내성을 보여 다제내성을 나타내었다.

플라스미드 분리, 염기서열결정 및 분석

S. aureus KH13과 *S. aureus* KH28로부터 플라스미드를 분리하여 염기서열을 결정하고 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과 pKH13과 pKH15는 Cm 내성을 매개하는 플라스미드로 pKH14는 기능을 알 수 없는 cryptic 플라스미드로 나

Table I – Plasmids of *S. aureus* KH13 and *S. aureus* KH28

Strain	plasmid	size (bp)	resistance
<i>S. aureus</i> KH13	pKH13	2909	Cm ^a
<i>S. aureus</i> KH28	pKH14	3124	cryptic
<i>S. aureus</i> KH28	pKH15	2907	Cm

^aCm, chloramphenicol.

타났다(Table I). 각각의 플라스미드의 염기서열은 NCBI의 GenBank에 EU170347(pKH13), EU164802(pKH14), EU170348(pKH15)로 등록하였다.

pKH13과 pKH15의 염기서열 분석

pKH13의 염기서열을 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 분석해본 결과 pKH13의 전체 염기서열은 Cm 내성을 매개하는 pC194⁸⁾와 99% 동일성을, pMC524/MBM¹⁸⁾과 97% 동일성을 나타내어 Cm 내성을 매개하는 플라스미드의 분류 중에서 전형적인 pC194 계열임을 알 수 있었다. pKH13과 pKH15는 전체 염기 수에서 2개의 차이를 보여 둘 다 Cm 내성을 매개하는 플라스미드임을 알 수 있었다(Table I). 차이를 보이는 염기서열이 Fig. 1에 나와 있으며 염기서열이 서로 다른 위치는 replication 단백질과 CAT 단백질 사이에 위치하여 두 단백질의 아미노산 서열에는 영향이 없었다.

Replication 단백질과 CAT 단백질

전체염기서열 분석에서 pKH13은 pC194 그리고 pMC524/MBM과 상당한 동일성을 보였으나 복제에 관여하는 Replication

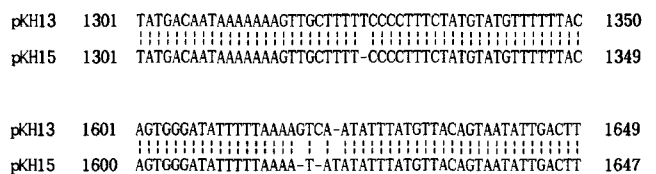


Fig. 1 – Comparative view of the nucleotide sequence of pKH13 and pKH15.

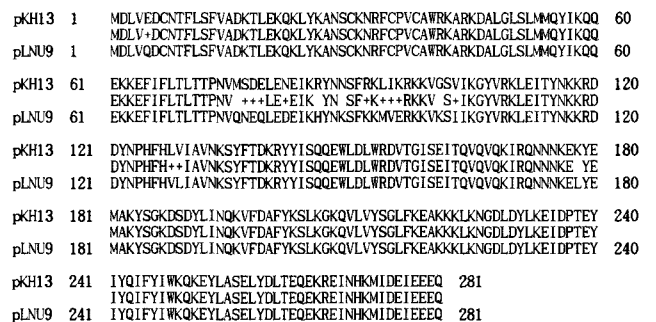


Fig. 2 – Comparative view of the replication protein of pKH13 and pLNU9.

pKH13	1	MNFNKLIDLNWRKKEIFNHYLNQQTTFSITTEIDISVLYRNKIQEGYKFPYAFIFLVTRV	60
pC194	1	MNFNKLIDLNWRKKEIFNHYLNQQTTFSITTEIDISVLYRNKIQEGYKFPYAFIFLVTRV	60
pKH13	61	INSNTAFRTGYNSDGLGYWDKLEPLYTIFDGVSKTFSGIWPVKNDFKEFYDLYSDVE	120
pC194	61	INSNTAFRTGYNSDGLGYWDKLEPLYTIFDGVSKTFSGIWPVKNDFKEFYDLYSDVE	120
pKH13	121	KYNGSGKLFPKTPIPENAFSLSIIPWTSFTGFNLAINNNSNYLLPIITAGKFINKNSIY	180
pC194	121	KYNGSGKLFPKTPIPENAFSLSIIPWTSFTGFNLAINNNSNYLLPIITAGKFINKNSIY	180
pKH13	181	LPLSLQVHHSVCDGYHAGLFMNSIQELSDRPNDWLL	216
pC194	181	LPLSLQVHHSVCDGYHAGLFMNSIQELSDRPNDWLL	216

Fig. 3 - Comparative view of the chloramphenicol acetyltransferase of pKH13 and pC194.

pKH14	1	MQYNTTRRSITENQDNKTLKDMTKSGKQRPWREKKIDNVSYADILEILKIKKAFNVKQCGN	60
pUSA01	1	MQYNTTRRSITENQDNKTLKDMTKSGKQRPWREKKIDNVSYADILEILKIKKAFNVKQCGN	60
pKH14	61	ILEFKPTDEGYLKLHKTWFCKSKLCPVCNWRRAMKNSYQAQKVIKVKPKARWFLT	120
pUSA01	61	ILEFKPTDEGYLKLHKTWFCKSKLCPVCNWRRAMKNSYQAQKVIKVKPKARWFLT	120
pKH14	121	LSTKNAIDGDTLEQSLKHLTKAFDRLSRYKWKQNLVGFMRSTEVTVNKNDSYQNHMHV	180
pUSA01	121	LSTKNAIDGDTLEQSLKHLTKAFDRLSRYKWKQNLVGFMRSTEVTVNKNDSYQNHMHV	180
pKH14	181	LLCVENAYFRKKNENYITQEEVNLQRALQVDRPVAANKAIKPNRKGDKDIESAIKETS	240
pUSA01	181	LLCVENAYFRKKNENYITQEEVNLQRALQVDRPVAANKAIKPNRKGDKDIESAIKETS	240
pKH14	241	KYSVKSSDFLTDDDEKNQEI VSDLEKGLYRKRMLSYGGLKQKH11NLDDVDEGDLNA	300
pUSA01	241	KYSVKSSDFLTDDDEKNQEI VSDLEKGLYRKRMLSYGGLKQKH11NLDDVDEGDLNA	300
pKH14	301	SDEDKTTDEEEK4HSITAIWVFEKQNYLRH	331
pUSA01	301	SDEDKTTDEEEK4HSITAIWVFEKQNYLRH	331

Fig. 4 - Comparative view of the replication protein of pKH14 and pUSA01.

pKH14	1	MNAIQNSISLRKILVVSLSILTLILSMVLDNFNKEAQAKNKNITADKNVETLNEKEITEKEL	60
pUSA01	1	MNAIQNSISLRKILVVSLSILTLILSMVLDNFNKEAQAKNKNITADKNVETLNEKEITEKEL	60
pKH14	61	KYIYQK111LLDKDGTAKDVENLENAKSRYGYVEGPFQKLNKNDIENKKTSSISPRVGGNY	120
pUSA01	61	KYIYQK111LLDKDGTAKDVENLENAKSRYGYVEGPFQKLNKNDIENKKTSSISPRVGGNY	120
pKH14	121	KNSGDCFYSEVLNSYEGELLTGN11TAVFEDVKAKNLKGVAKKLAK1G1KGNLAGIAATMV	180
pUSA01	121	KNSGDCFYSEVLNSYEGELLTGN11TAVFEDVKAKNLKGVAKKLAK1G1KGNLAGIAATMV	180
pKH14	181	SKDVQCNLKYGLL	193
pUSA01	181	SKDVQCNLKYGLL	193

Fig. 5 - Comparative view of the hypothetical protein of pKH14 and pUSA01.

단백질의 아미노산 서열은 pC194의 replication 단백질과는 85% 동일성, 94% 유사성을 보였으며 오히려 *Staphylococcus chromogenes*¹⁹⁾의 lincosamide 내성을 매개하는 pLNU9과 93% 동일성, 98% 유사성을 나타내었다(Fig. 2). CAT 단백질의 경우에는 pC194와 100% 동일성을 보여주었다(Fig. 3).

Cryptic plasmid pKH14

pKH14의 염기서열을 분석해 본 결과 pKH14는 pUSA01²⁰⁾과 99% 동일성을 보여주었으며 1990년 부산에서 분리된 pKH3²¹⁾과도 상당한 동일성을 보여주었다. pKH14와 pUSA01 둘 다 replication 단백질과 hypothetical 단백질을 가지고 있었는데 두 단백질에서 아미노산 서열은 100% 동일하게 나타났다(Fig. 4~5). 한편 hypothetical 단백질이 없는 pKH3과의 비교 에서는 replication 단백질에서 94% 동일성, 97% 유사성을 보여주었다.

고 찰

현재 항색포도상구균의 감염 치료에 더 이상 Cm은 사용되지

않고 있으며 그것으로 인하여 Cm 내성 균주를 분리하기는 매우 어렵다. 1989~1990년 부산에서 분리된 항색포도상구균 중 Cm 내성을 보이는 균주가 35%로 나타났으나 2004년 부산에서 분리된 50개의 균주 중에는 Cm 내성 균주가 없었으며 같은 해 1월부터 6월 사이에 분당제생병원으로부터 분양된 35개의 균주에서 본 연구에 사용된 2개의 Cm 내성 균주를 분리할 수 있었다. 마찬가지로 2005년 7월부터 2006년 12월까지 부산의 한 병원에서 분리된 50개 균주 중에서도 Cm 내성 균주는 분리되지 않았다.¹⁰⁾ 저자 등은 1990년 부산 소재 병원에서 분리한 항생제 다제내성균 *S. aureus* SA2로부터 pC221 계열의 Cm 내성 플라스미드 pKH7을 분리 동정하여¹¹⁾ 염기서열을 보고하였으며^{12,13)} 본 연구에서 pC194 계열의 플라스미드 두 종의 염기서열을 보고하였다. 현재의 경향으로 보아 당분간 더 이상의 Cm 내성 플라스미드를 분리하기가 어려울 것으로 보여 pKH7, pKH13 그리고 pKH15는 차후에 다시 나타날지도 모르는 Cm 내성 플라스미드와의 비교를 위한 중요한 자료가 될 것으로 사료된다. 한편 pKH13과 pKH15는 단백질 서열에는 영향이 없는 위치에서 염기서열 차이를 보였다.

S. aureus KH28은 Cm 내성 플라스미드 pKH15 외에 기능을 알 수 없는 pKH14를 가지고 있었는데 이 플라스미드와 유사한 플라스미드는 1990년 부산에서 분리된 pKH3²¹⁾과 2007년 미국에서 분리된 pUSA01²⁰⁾이 있다. 이 플라스미드가 부산에서 16년 지난 후에도 분리되고 또한 미국에서도 현재 분리되고 있다는 것은 이 플라스미드가 나름대로 중요한 기능을 하고 있기 때문일 것으로 사료되며 현재 이 플라스미드의 기능을 규명하는 중에 있다.

또한 *S. aureus* KH13과 *S. aureus* KH28의 내성 중 Cm을 제외한 Am, Cl, Em, Gm, Km, Sm, Tm 그리고 Nf 대한 내성은 모두 염색체에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

결 론

Chloramphenicol(Cm), ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, tobramycin 그리고 norfloxacin에 내성을 나타내는 다제내성균 *S. aureus* KH13과 *S. aureus* KH28로부터 플라스미드를 분리하고 염기서열을 결정하였다. *S. aureus* KH13에서 분리한 pKH13은 Cm 내성을 매개하는 pC194 계열의 플라스미드이었으며 *S. aureus* KH28로부터 분리한 pKH15는 pKH13과 같은 Cm 내성 플라스미드로 확인되었고 pKH14는 기능을 알 수 없는 플라스미드로 나타났다. *S. aureus* KH13과 *S. aureus* KH28의 내성 중 Cm을 제외한 다른 항생제에 대한 내성은 염색체에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2006학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여

연구되었음.

문헌

- 1) Shaw, W. V. : Chloramphenicol acetyl transferase: enzymology and molecular biology. *Crit. Rev. Biochem.* **14**, 1 (1983).
- 2) Sands, L. C. and Shaw, W. V. : Mechanism of chloramphenicol resistance in staphylococci: characterization and hybridization of variants of chloramphenicol acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 299 (1973).
- 3) Shaw, W. V. : Bacterial resistance to chloramphenicol. *Br. Med. Bull.* **40**, 36 (1984).
- 4) Brenner, D. G. and Shaw, W. V. : The use of synthetic oligonucleotides with universal templates for rapid DNA sequencing: results with staphylococcal replicon pC221. *EMBO J.* **4**, 561 (1985).
- 5) Brueckner, R. and Matzura, H. : Expression of a chloramphenicol resistance determinant carried on hybrid plasmids in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Gene* **32**, 151 (1984).
- 6) Lyon, B. R., May, J. W. and Skurray, R. A. : Analysis of plasmids in nosocomial strains of multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 817 (1983).
- 7) Wilson, C. R., Skinner, S. E. and Shaw, W. V. : Analysis of two chloramphenicol resistance plasmids from *Staphylococcus aureus*: insertional inactivation of Cm resistance, mapping of restriction sites, and construction of cloning vehicles. *Plasmid* **5**, 245 (1981).
- 8) Horinouchi, S. and Weisblum, B. : Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**, 815 (1982).
- 9) Gillespie, M. T. and Skurray, R. A. : Structural relationships among chloramphenicol resistance plasmids of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Letters* **51**, 205 (1988).
- 10) Lee, J. Y., Park, J. H. and Moon, K. H. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Busan. *Yakhak Hoeji* **51**, 164 (2007).
- 11) Lee, D. W. and Moon, K. H. : Characterization of chloramphenicol resistant plasmid of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yakhak Hoeji* **40**, 621 (1993).
- 12) Yoon, S. J., Lee, D. W., Kim, W. K., Shin, C. K., Im, S. W. and Moon, K. H. : Nucleotide sequence of Rep and Cat proteins encoded by chloramphenicol-resistance plasmid pKH7. *Yakhak Hoeji* **39**, 676 (1995).
- 13) 문경호, 박봉동, 이동석, 이백락 : 클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7의 Pre 단백질의 염기서열 결정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 566 (1998).
- 14) 김종명, 김기현, 문경호 : 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. *약학회지* **36**, 255 (1992).
- 15) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 368-369 (1982).
- 16) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 250-251 (1982).
- 17) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. : Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403 (1990).
- 18) Bhakta, M. and Bal, M. : Identification and characterization of a shuttle plasmid with antibiotic resistance gene from *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiol.* **46**, 413 (2003).
- 19) Luethje, P., von Kockritz-Blickwede, M. and Schwarz, S. : Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyltransferase gene lnu(A). *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 600 (2007).
- 20) Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F. and Sensabaugh, G. F. : Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**, 731 (2006).
- 21) 고창학 : 경성대학교 박사학위 논문집, pp. 35-36 (2000).