

*Staphylococcus aureus*의 항생제 내성 Plasmid에 관한 연구

邊宇玄 · 金英善 · 曹銀姬 · 權桐鉉 · 李浩柱 · 洪淳周*

강원대학교 생물학과 *강원대학교 생화학과

R-Plasmids in *Staphylococcus aureus*

Byeon, W.-H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea, and S.J. Hong*

Department of Biology, *Department of Biochemistry, Kangweon National University

Small size antibiotic resistance plasmids having molecular weights less than 10 Mdal were isolated and characterized from ten clinically isolated multiple resistant *Staphylococcus aureus*. Agarose gel electrophoresis profiles and antibiotic resistance patterns divided these strains into four groups.

Strain 2-23-6, the representative strain of a group of five strains conferred two plasmids of molecular weights 1.6×10^6 dal and 2.0×10^6 dal. The small plasmid (pSBK 112) specified macrolides, lincosamides and streptogramin type B (MLS) resistance gene which are expressed constitutively. Large plasmid (pSBK 125) specified chloramphenicol resistance gene which is inducible. Strain 10-5 conferred a 3.0×10^6 dal plasmid (pSBK 141) which carry an inducible ampicillin resistance gene and strain P-H-2 conferred an 1.6×10^6 dal plasmid (pSBK 190) which carry a constitutive MLS resistance gene. Strain D-H-1 conferred four plasmids of molecular weights 0.8×10^6 dal (pSBK 201), 1.6×10^6 dal (pSBK 202), 2.5×10^6 dal (pSBK 203), and 1.2×10^7 dal (pSBK 204), respectively. Among those four plasmids, only pSBK 203 specified chloramphenicol resistance gene.

Curing of constitutive MLS resistance using acriding orange or ethidium bromide in 2-23-6 and P-H-2 strains produced 'inducible' MLS resistance strains which are less resistant to MLS than the wild type strains, suggesting that there are two resistance genes in both strains; one is constitutive and the other is inducible.

그람 양성균들이 갖는 plasmid에 관한 연구는 주로 *Staphylococcus*, *Streptococcus*, 및 *Bacillus*에 대해 이루어지고 있으며 이중 *Staphylococcus* 속을 대상으로 한 연구는 Wilson과 Baldwin(1978), Wilson등(1981) 및 Iodanescu(1977)에 의해, *Streptococcus* 속을 대상으로한 연구는 LeBlanc와 Lee(1979), Macrina등(1980) 및 Clewell(1981) 등에 의해, 또 *Bacillus* 속을 대상으로한 연구는 Lovett(1983)와 Shivarkumar등(1979)에 의해 각각 집중적으로 수행되었다. 이들 각각에서 분리된 plasmid

들간의 形質轉換 및 轉換된 세균내에서의 遺傳子 發現에 관한 연구는 Ehrlich(1977)에 의해 시도된 후 Gryczan등(1980)에 의해서는 cloning vehicle의 개발로 까지 진전되었다.

기초과학적 측면에서의 이러한 연구의 궁극적 목적중의 하나는 그람 양성균에서 분리된 plasmid상의 抗生物質에 대한 誘發性 低抗因子의 誘發機作에 관한 연구로써 이미 erythromycin 低抗性 誘發機作(Horinouchi와 Weisblum 1980)과 chloramphenicol 低抗性 誘發機作(Byeon과 Weisblum, 1984) 등이 밝혀지고 있으며

나아가 이들 機作이 밝혀진 誘發性 低抗因子들의 promoter를 사용한 遺傳子 發現調節体系도 확립되기에 이르렀다. 본 연구는 일차적으로 국내에서 임상적으로 분리된 *Staphylococcus aureus* 중 抗生物質에 대해 다중 저항성을 나타내는 세균들로부터 plasmid를 분리, 미 보고 여부를 확인하며 이들이 내포한 抗生物質 低抗性 因子的 誘發性 發現여부 및 그 發現機作을 연구하는 것을 궁극적인 목적으로 한다.

材料 및 方法

菌株

서울의대 부속병원 임상감사실에서 분리된 *S. aureus* 중 抗生物質에 대한 다중 低抗性을 가진 균주 열균주를 분주 받아 실험에 사용하였다. 분주당시 각 균주가 갖는 低抗性의 종류는 Table 1과 같았다.

抗生物質에 대한 低抗性 정도측정 및 비교

분주받은 열균주들의 抗生物質에 대한 저항성 정도를 세분함으로써 이들 균주들중 같은 균주가 있는지의 여부를 알기 위해 한천배지에 각 抗生物質 보관용액(10mg/ml) 5μl를 백금

Table 1. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* strains.

Strain	Antibiotic resistance markers ^a											
	Ap	Pe	Me	Cd	Ct	Tc	Sm	Gm	Km	Cm	Em	Lm
2-23-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10-5	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
HB-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16-1	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
N-N-3	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
2-26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bo-H-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P-N-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P-H-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-H-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^a) Ap, Ampicillin; Pe, Penicillin; Me, Methicillin; Cd, Cepharolidine; Ct, Cephalothin; Tc, Tetracyline; Sm, Streptomycin; Gm, Gentamycin; Km, Kanamycin; Cm, Chloramphenicol; Em, Erythromycin; Lm, Lincomycin. +Denotes presence of the resistance marker.

니로 streaking한 후 잘 흡수시키고 이와 교차하여 균주들의 현탁액을 streaking하여 배양, 나타난 生長沮害部位의 폭을 비교하였다.

Plasmid의 분리

Lysozyme-SDS 방법 (Guerry등, 1973)에 의해 균으로부터 분리하였으며 그람 陽性이면서 ampicillin 저항성인 이들 균의 세포벽 형성을 저해하기 위하여 균 배양시 cephaloridine (2μg/ml)을 처리하였다.

전기영동

0.6%의 agarose (Meyers등, 1976)의 minigel (70×85mm)을 수평으로 완충액에 잠근채 50~60V로 1시간 전개하였으며 사용한 완충액은 0.5μg/ml의 ethidium bromide를 포함한 Tris-acetate 완충액이었다.

Plasmid의 curing

Ethidium bromide (2μg/ml) 혹은 acridine orange (20~100μg/ml)를 처리하여 18시간 암소에서 배양한 균 현탁액을 희석, 한천배지에 접종하여 단일 균체로 분리한 후 抗生物質이 포함된 배지에 옮겨 이들 균주의 低抗性 소실 여부를 확인하였다 (Bouanchaud등, 1969; Johnston과 Richmond, 1970). 선별된 저항성 소실 균주는 상기의 방법에 의해 plasmid의 검출을 시도, plasmid의 curing 여부를 확인하였다.

최소 저해 농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)

지수성장기 중반의 균 현탁액을 새 액체배지에 약 300배 정도로 희석한 후 抗生物質을 처리하고 37°C에서 18시간동안 정치배양하여 균이 자라지 않는 최소 농도를 최소저해농도로 정하였다.

低抗性 因子的 誘發性發現 여부 결정

18시간 액체배양한 균 현탁액을 다시 열배 희석, 2시간동안 전배양하여 지수성장기 중반상태의 세포로 만든 후 660nm에서의 흡광도가 0.01이 되도록 희석, 새개의 250ml Klett flask에 분배한다. 이중 한 flask의 균 현탁액은 抗生物質을 처리하기 전에 미리 처리하고자 하는 抗生物質농도의 약 10⁻² 정도로 처리, 약 30분 내지 1시간동안 低抗性 誘發을 시행한 후 MIC 값의 약 1/5~1/10 정도로 抗生物質을 처리하며 나머

지 두 flask 중 하나에는 誘發過程 없이 직접 抗生物質을, 마지막 것은 抗生物質을 전혀 처리 하지 않고 그대로 각각 37°C에서 배양, 매 30분마다 660nm에서 흡광도를 측정함으로써 대조구, 유발구 및 비유발구의 균 증식상태를 비교한다.

結 果

低抗性的 구분

Fig. 1에서와 같이 ampicillin에 대해서는 모든 균주가 저항성을 갖지만 그중 10-5, 16-1 및 D-H-1이 다른 균주에 비해 약간 낮은 정도의 저항성을 보여주고 있으며 tetracycline에 대해서는 N-N-3가 低抗性이 없는 것이 다른 ampicillin의 경우와 똑같은 경향성을 나타내고 있다. Streptomycin 저항성은 10-5, 16-1 및 N-N-3가 低抗性이 없는 반면 D-H-1은 여타 균주들 보다 약한 저항성을 보여주고 있고 gentamycin에 대한 저항성에서는 10-5와 16-1만 약한 저항성을, N-N-3는 감수성을, 그 나머지 모든 균주는 같은 정도의 강한 저항성을 각각

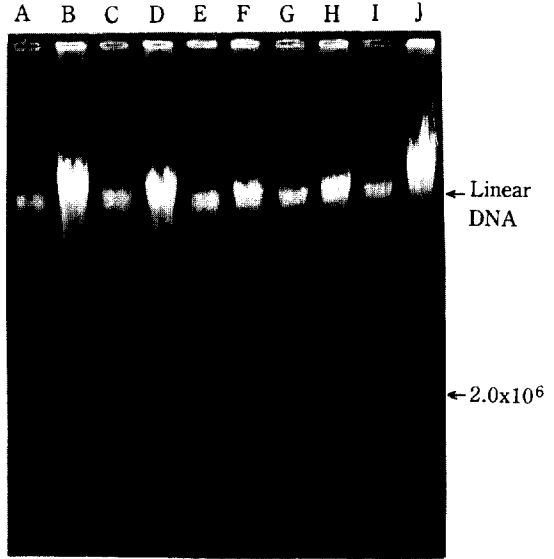


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis profiles of plasmid DNA obtained from *S. aureus* strains: (A) 2-23-6; (B) 10-5; (C) HB-26; (D) 16-1; (E) N-N-3; (F) 2-36; (G) Bo-H-1; (H) P-N-3; (I) P-H-2; (J) D-H-1.

보여주고 있다. Erythromycin에 대한 저항성은 10-5와 16-1은 감수성을, N-N-3만은 약한 저항성을, 나머지는 모두 강한 저항성을 각각 보여주고 있고 chloramphenicol에 대한 저항성은 10-5, 16-1, N-N-3 및 P-H-2가 감수성을 D-H-1은 약한 저항성을, 나머지는 강한 저항성을 각각 보여주고 있다. 이들 결과와 Table 1과를 비교하면 N-N-3과 D-H-1 및 P-H-2가 다른 어느 집단에도 속하지 않는 균주로 구별되고 있으며 10-5와 16-1이 별개의 균으로, 나머지 2-23-6, HB-26, 2-36, Bo-H-1, 및 P-N-3가 같은 균으로 각각 구분되고 있다.

Plasmid의 전기영동상

각 균주로 부터 분리한 plasmid의 0.6% agarose 전기영동상은 Fig. 2에서 보는 바와 같으며 R6K(분자량 약 25×10^6 dal)와 pC194(분자량 약 2×10^6 dal)을 표준 분자량 plasmid로 사용한 계산에서 2-23-6, HB-26, 2-36, Bo-H-1 및 P-N-3는 분자량이 각각 2.0×10^6 및 1.6×10^6 dal인 비교적 소형의 plasmid를 갖고 있는 것으로 나타났다. 그리고 10-5와 16-1은 3.0×10^6 dal인 plasmid 한 개씩을, P-H-2는 1.6

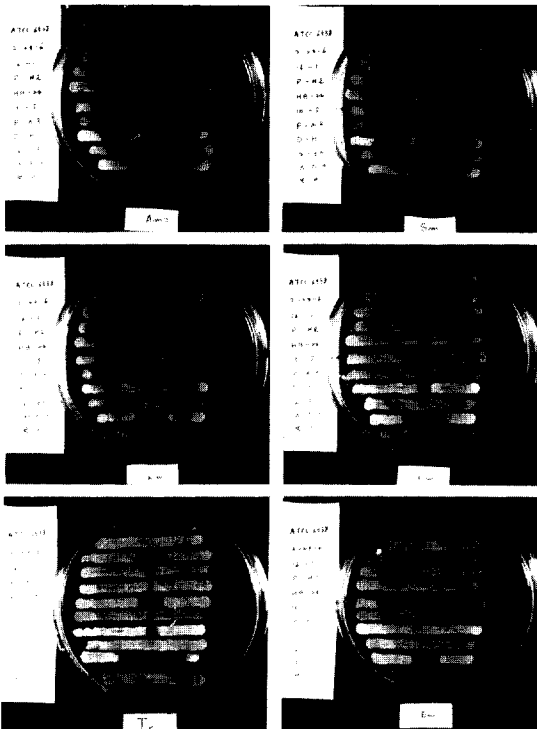


Fig. 1 Cross streaking of antibiotics and cell suspension for resistance detection.

Table 2. Properties of small plasmids from *S. aureus*.

Strain	Plasmid	Molecular weight	Resistance marker
2-23-6	pSBK 112	1.6×10^6	Lm, Em
	pSBK 125	2.0×10^6	Cm
10-5	pSBK 141	3.0×10^6	Ap
P-H-2	pSBK 190	1.6×10^6	Lm
D-H-1	pSBK 201	0.8×10^6	
	pSBK 202	1.6×10^6	
	pSBK 203	2.5×10^6	Cm
	pSBK 204	1.2×10^7	

$\times 10^6$ dal인 plasmid 한개를 갖고 있는 것으로 나타났으며 D-H-1은 0.8×10^6 , 1.6×10^6 , 2.5×10^6 및 1.2×10^7 dal인 plasmid 네개를 갖고 있는 것으로 나타났고 N-N-3에서는 아무 plasmid도 발견되지 않았기 때문에 이후의 실험에서 제외되었다.

위 두 결과를 토대로 2-23-6, 10-5, P-H-2 및 D-H-1의 네 종만을 다른 균들과 구별되는, 저항성 및 plasmid를 내포한 대표종으로 선택, 차후의 실험을 수행하였으며 이들이 포함하고 있는 plasmid의 명명된 이름 및 분자량은 Table 2와 같다.

Curing에 의한 plasmid상의 抵抗性 因子 확인

Ethidium bromide와 acridine orange를 사용하여 이들 plasmid를 curing했을때 함께 없어지는 저항성 인자는 한천배지상에서의 抗生物質에 의한 生長阻害領域의 생성과 plasmid분리 및 전기영동상의 비교로 확인하였다. Fig. 3-(1)과 Fig. 4-(1)은 2-23-6의 plasmid pSBK 112상에 lincomycin과 erythromycin 抵抗性 因子가 존재하고 pSBK 125상에는 chloramphenicol 저항성 인자가 존재하고 있음을 보여준다. 균주 10-5에 포함된 plasmid pSBK 141에는 ampicillin 저항성 인자가(Fig. 3-(2), Fig. 4-(2)), P-N-2가 포함한 pSBK 190에는 lincomycin 저항성 인자가 존재하고 있음도 밝혀졌다(Fig. 3-(3), Fig. 4-(3)). D-H-1의 네 plasmid 중에서는 pSBK 203만이 chloramphenicol 저항성 인자를 갖고 있음이 확인되었고 나머지 plasmid

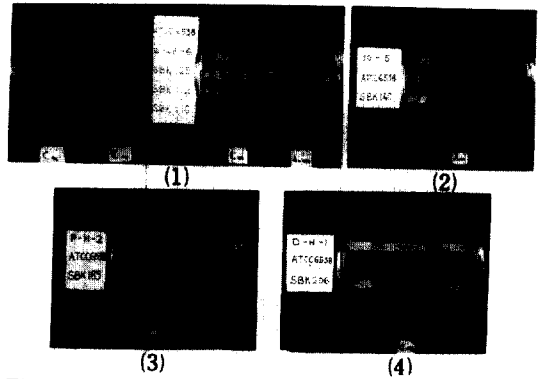


Fig. 3 Antibiotics resistance of the originally resistant strains and of the 'cured' sensitive strains. (1) Chloramphenicol resistance of 2-23-6 strain carrying plasmids pSBK 112 and pSBK 125 and of pSBK 112-cured SBK 125 strain, pSBK 125-cured SBK 112 strain and both cured SBK 110 strain; (2) Ampicillin resistance of 10-5 strain carrying plasmid pSBK 141 and of cured SBK 140 strain; (3) Erythromycin and lincomycin resistance of P-H-2 strain carrying plasmid pSBK 190 and of cured SBK 189 strain; (4) Chloramphenicol resistance of D-H-1 strain carrying plasmid pSBK 203 and of cured 206 strain.

의 저항성 인자와의 관련성은 불확실하였다(Fig. 3-(4), Fig. 4-(4)).

각 균주들에 대한 抗生物質의 最小저해농도

각 균주들에 대한 抗生物質의 MIC값은 Table 3과 같다. 균주들에 대한 ampicillin MIC 값은 한천배지상에서의 streaking법에 의한 生長阻害領域 측정시에는 두 가지 종류로만 구별되었던 것에 비해 여러농도로 나타났고 다른 항생제들은 대부분 Fig. 1의 한천배지상 측정결과로 예상되던 바대로 나타났다. 즉 tetracycline 抵抗性은 세 가지로, streptomycin 저항성은 두

Table 3. Minimal inhibitory concentrations(MICs) of some representative antibiotics against representative strains from each *S. aureus* group.

Strain	MICs (in $\mu\text{g/ml}$)					
	Ap	Tc	Sm	Km	Cm	Em
2-23-6	2,000	200	500	>8,000	100	2,000
10-5	125	50	-	500	-	-
P-H-2	1,000	200	500	>2,000	-	2,000
D-H-1	250	100	250	>2,000	100	2,000
ATCC 6538	0.25	1.25	5	10	10	1.25

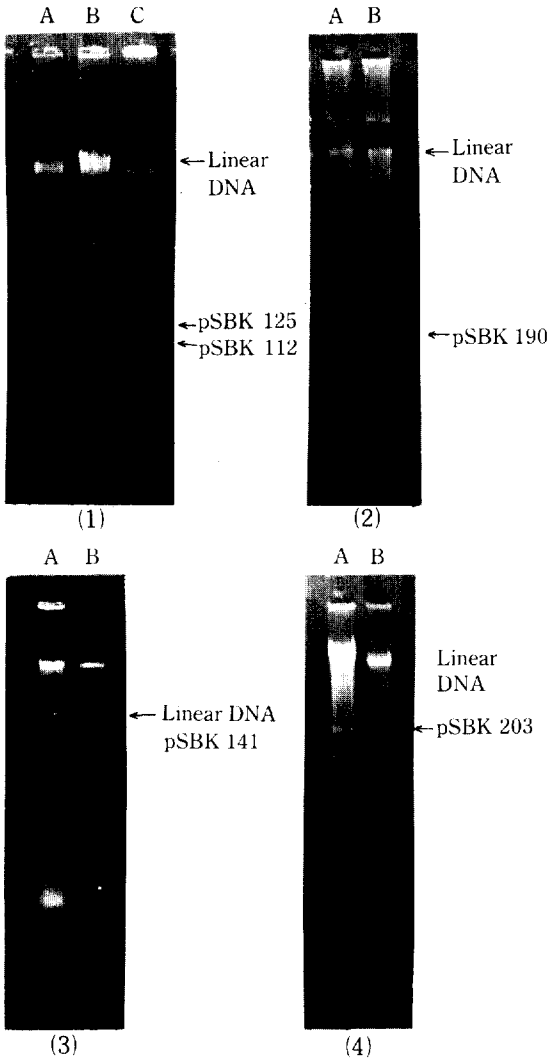


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis profiles of plasmid DNA from the original strains and cured strains. (1) Plasmid from 2-23-6 (A) pSBK 112-cured SBK 125 (B), and pSBK 125-cured SBK 112 strain (C); (2) Plasmid from 10-5 (A) and pSBK 141-cured SBK 140 strain (B); (3) Plasmid from P-H-2 (A) and pSBK 190-cured SBK 189 strain (B); (4) Plasmid from D-H-1 (A) and pSBK 203-cured SBK 206 strain (B).

가지로 구별되었으며 chloramphenicol 저항성은 한 가지, erythromycin 저항성은 두 가지로 각각 나타났다. Kanamycin의 경우 500 µg/ml과 2,000 µg/ml 이상의 두 종류로 나누면 앞의 한천배지상의 결과와 크게 어긋나지 않는 것으로 생각된다.

Table 4. Expression patterns of antibiotic resistance in representative strains of *S. aureus*

Strain	Antibiotic resistance markers					
	Ap	Tc	Sm	Km	Cm	Em
2-23-6	I ^a	I	I	?	I	C ^b
10-5	I	I	-	I	-	-
P-H-2	I	I	I	C	-	C
D-H-1	I	I	I	I	I	C

^{a)} Inducible expression.

^{b)} Constitutive expression.

저항성 인자의 誘發性 發現 확인

Table 4에 나타난 것처럼 erythromycin에 대한 저항성을 갖는 2-23-6, P-H-2 및 D-H-1의 세균주는 모두 지속성 발현을 하는 것으로 나타났고 또 P-H-2균의 kanamycin 저항성도 지속성 발현을 하는 것으로 나타났다. 2-23-6균주의 kanamycin에 대한 유발성 실험은 이 균주의 MIC값이 8 mg/ml 정도로 극히 높아 측정에 어려움이 있어 제외되었으며 이상 언급한 경우를 제외한 나머지 경우는 모두 유발성 발현을 하는 것으로 나타났다. 이들 중 curing 실험으로 plasmid 상에서 그 존재가 확인된 2-23-6의 chloramphenicol 저항성 인자와 erythromycin 저항성 인자, 10-5의 ampicillin 저항성 인자, P-H-2의 erythromycin 저항성 인자, D-H-1의 chloramphenicol 저항성 인자 및 2-23-6 균주에서 pSBK 112가 curing된 SBK 125에서 나타나는 erythromycin 저항성의 유발양상이 Fig. 5에 나타나 있다.

考 察

2-23-6균주에 포함된 pSBK 112 (1.6×10^6) 및 pSBK 125 (2.0×10^6)의 curing에 의한 低抗性因子 소재확인 결과는 lincomycin과 erythromycin 저항성 인자가 pSBK 112에, chloramphenicol 저항성 인자가 pSBK 125에 각각 존재하는 것으로 확인되었다. 그러나 pSBK 112가 curing된 균주인 SBK 125와 pSBK 112와 pSBK 125가 모두 curing된 SBK 110에 대한

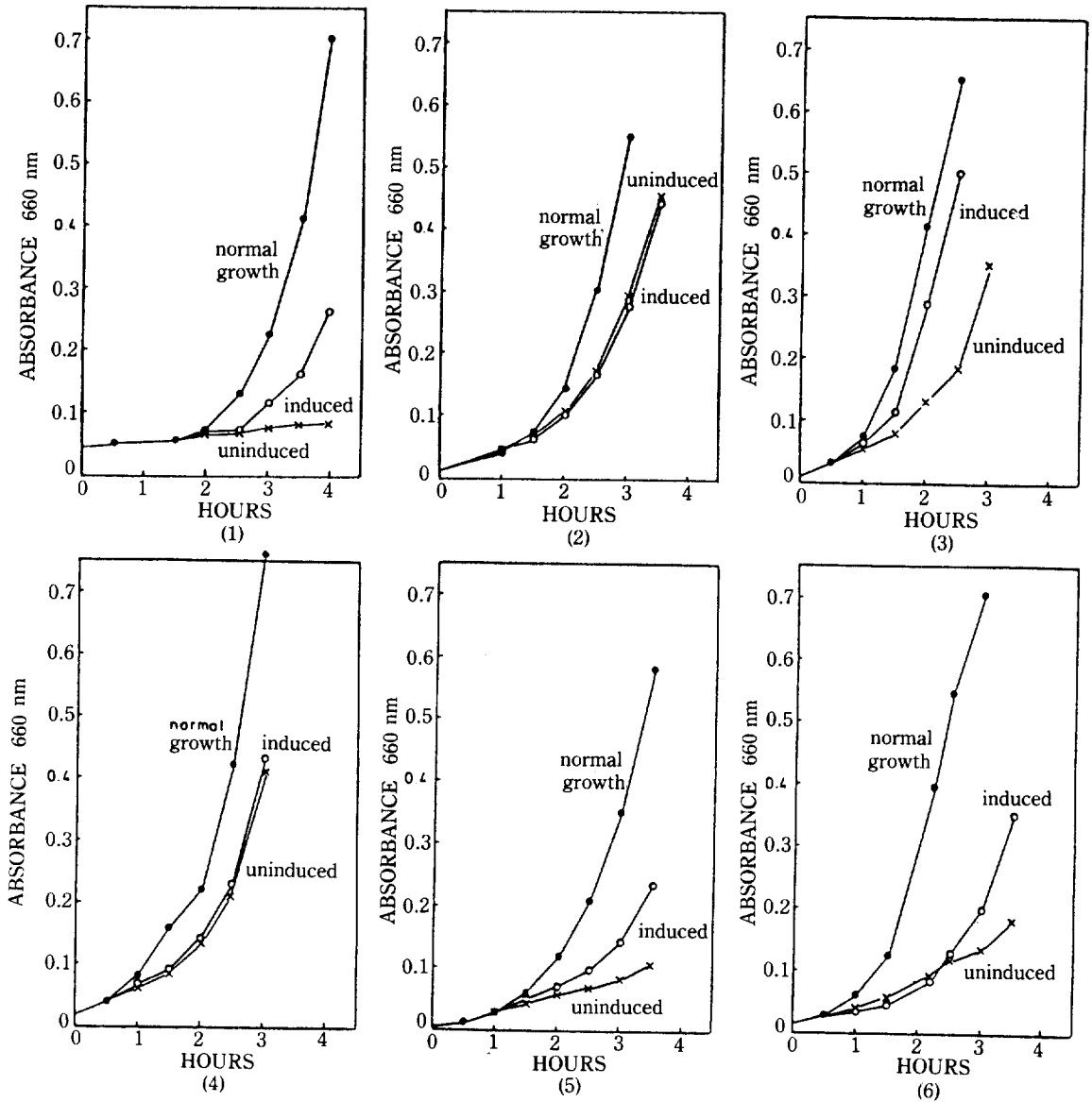


Fig. 5. Expression of antibiotics resistance. (1) Inducible chloramphenicol resistance in 2-23-6; (2) Constitutive erythromycin resistance in 2-23-6; (3) Inducible ampicillin resistance in 10-5; (4) Constitutive erythromycin resistance in P-H-2; (5) Inducible chloramphenicol resistance in D-H-1; (6) Inducible erythromycin resistance in SBK 125. ●, Normal growth; ○, Induced; ×, Uninduced.

저항성 실험 결과 (Fig. 3⁽⁴⁾)에서는 lincomycin 저항성은 음성대조구에서와 똑같은 수준으로 소멸하였으나 erythromycin 저항성은 아직 상당한 정도 남아 있음이 확인되고 있다. Erythromycin을 포함한 macrolide 계열 항생물질과 lincosamide 및 streptogramin type B 계열 항생물질에 대해 저항성을 나타내는 인자는 RNA

methylase 유전자로서 이 遺伝子産物이 發現하면 세 계열 항생물질에 공히 저항성을 갖는 것으로 알려져 왔다 (Lai 등, 1973). 그러나 *S. aureus*의 MLS 저항성 인자는 lincosamide 계열 항생물질이나 streptogramin type B 계열의 항생물질에 의해서는 직접 그 저항성이 誘發되지 않고 단지 erythromycin에 의해서만 유발되

며 일단 유발되어야 나머지 항생물질에 대한 저항성이 생기기 때문에 lincosamide 계열이나 streptogramin type B 계열 抗生物質만을 처리했을 경우에는 이들에 대한 表現形質이 감수성인 것처럼 나타난다고 알려져 있다 (Lai 등, 1973). 2-23-6 균주가 가지고 있는 pSBK 112 plasmid 상의 MLS 저항성 인자는 lincomycin에 대해 직접 抵抗性을 나타낼 뿐 아니라 誘發性-持續性 發現 실험에서도 예상대로 持續性 發現을 하는 인자로 확인되었다. 그러나 이 plasmid가 curing된 SBK 125에서도 아직 erythromycin 저항성이 존재하였으며 이 저항성은 erythromycin에 의해 유발이 되고 있었다. 그람 양성균 중에서 *Streptomyces* 속에서는 대부분 MLS 저항성 인자가 지속성 발현을 하는 것으로 알려져 있으나 (Graham과 Weisblum, 1979) *Staphylococcus*나 *Streptococcus* 속의 MLS 저항성 인자는 반대로 거의가 유발성 발현을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 *S. aureus* 2-23-6 균주가 지속성 발현인자와 함께 유발성인 MLS 저항성 인자를 한 세포내에 함께 가지고 있다는 것은 매우 흥미로운 사실이다. P-H-2가 가지고 있는 1.6×10^6 dal의 plasmid는 curing에 의한 결과에서처럼 erythromycin-lincomycin 저항성 인자를 내포하고 있는 바 2-23-6 균주의 SBK 112와 동일 plasmid일 가능성을 배제할 수 없으나 구체적인 확인은 본 보고에는 포함되지 않았고 앞으로 restriction mapping 등의 방법을 통해 결정될 수 있을 것이다. Fig. 5의 저항성 인자들의 발현방식 실험 결과들은 잠정적으로 소형 분자량 plasmid 상에 존재하는 것으로 확인된 것들만을 보여주고 있으나 Table 4에 나타난 각 抗生物質들에 대한 균주들의 誘發性-持續性 판정은 실제로 각 균주와 항생물질간의 組合을 모

두 수행, 확인한 것들이다. 여기서 나타난 저항성은 erythromycin 저항성 인자들이 모두 지속성 발현을 하는 것으로 나타난 바 이중 2-23-6과 P-H-2의 경우는 앞의 언급에서처럼 분자량 1.6×10^6 dal인 plasmid 상에 존재하는 지속성 발현 인자 외에 유발성 erythromycin 저항성 인자가 하나 더 존재하는 것으로 확인되었다. D-H-1의 경우는 어느 plasmid 상에 erythromycin 저항성 인자가 존재하는지 확인치 못하고 있으나 지속성 발현인자가 없어진 균주에서 2-23-6이나 P-H-2의 경우와 똑같이 유발성 발현을 하는 인자의 존재가 확인되고 있다 (자료로 제시하지 않았음). 궁극적으로 *S. aureus*의 erythromycin 저항성 인자는 이미 많은 보고에서처럼 유발성 발현이 원칙적이나 인체의 질병과 관련된 균의 경우 MLS 계열, 항생물질의 과도한 사용에 따른 선택적 환경 때문에 지속성 발현을 하는 인자를 가진 개체들이 살아 남았고 우점종화한 것이 아닌가 짐작된다.

P-H-2의 streptomycin 저항성 및 kanamycin 저항성도 그람 양성균에는 이례적인 비유발성 발현인 바 이들 抵抗性들이 遺傳子 産物의 지속성 발현에 의한 것인지 혹은 突然變異에 의한 저항성 획득인지는 현재로는 확실치 않다.

이들을 제외한 나머지 모든 실험균들은 유발성 발현으로 나타났는데 이는 일반적인 그람 양성균의 경향성과 일치하고 있다. 본 연구에서 밝혀진 각 plasmid 상에 있는 유발성 저항인자들에 대해서는 장차 그 유발기작에 관한 연구가 DNA 염기서열 결정 및 특정 유전자 산물의 시험관내 합성 등의 방법을 통해 계속 수행될 것이며 이 기작들은 이미 밝혀진 수종 *Staphylococcus* 및 *Streptococcus*에서의 결과와 비교 연구될 것이다.

적 요

임상적으로 분리된 항생물질에 대한 다중 저항성을 갖는 열가지 균주의 *Staphylococcus aureus*로 부터 plasmid를 분리하고 이들의 특징을 규명하였다. 이들 열가지 균주는 plasmid의 전기영동상과 抗生物質 저항성 정도에 의해 각각 서로 구별되는 네군의 균주들로 나누어 졌으며 첫째군에 속하는 2-23-6은 분자량이 1.6×10^6 dal (pSBK 112) 및 2.0×10^6 dal (pSBK 125) 되는 두 plasmid를 포함하고 있었고 둘째군의 10-5는 3.0×10^6 dal (pSBK 141)인 plasmid 한개, 셋째군의 P-H-2는 1.6×10^6 dal (pSBK 190)인 plasmid를 한개 갖고 있었다. 넷째군인 D-H-1에는 0.8×10^6 dal (pSBK 201), 1.6×10^6 dal (pSBK 202), 2.5×10^6 dal (pSBK 203) 및 1.2×10^7 dal (pSBK 204)

의 네개 plasmid가 확인되었다. 이중 pSBK 112와 pSBK 190은 MLS계열 항생물질에 지속성발현을 하는 저항성 인자를 가지고 있었으며 pSBK 125와 pSBK 203은 유발성 발현을 하는 chloramphenicol 저항성인자를, pSBK 141은 유발성 발현을 하는 ampicillin저항성 인자를 각각 가지고 있었다.

지속성 발현의 MLS저항성 인자가 포함된 pSBK 112와 pSBK 190이 curing 된 2-23-6 과 P-H-2는 유발성 발현의 MLS저항성 인자를 다른 장소에 환개 더 가지고 있는 것으로 밝혀졌다.

사 사

본 연구는 1984년도 문교부 기초과학학술연구 조성비의 지원에 의해 수행되었으며 이를 감사드립니다.

REFERENCES

- Bouanchaud, D. H., M.R. Scavizzi, and Y.A. Chabbert, 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* **54**, 417-425
- Byeon, W.-H., and B. Weisblum, 1984. Post-transcriptional regulation of chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **158**, 543-550
- Clewell, D. B., 1981. Conjugation and resistance transfer in Streptococci and other gram positive species: Plasmids, sex pheromones and conjugative transposons. in: Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids, S.B. Levy, R.C. Clowes and E.L. Koenig, eds., Plenum, New York
- Ehrlich, S. D., 1977. Replication and expression of plasmids from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 1680-1682
- Graham, M. Y., and B. Weisblum, 1979. 23S ribosomal ribonucleic acid of macrolide-producing Streptomycetes contains methylated adenine. *J. Bacteriol.* **137**, 1464-1467
- Gryczan, T., A.G. Shivarkumar, and D. Dubnau, 1980. Characterization of chimeric plasmid cloning vehicles in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **141**, 246-253
- Guerry, P., D.J. LeBlanc, and S. Falkow, 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **116**, 1064-1066
- Harwood, C. R., D.M. Williams, and P.S. Lovett, 1983. Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene* **24**, 163-169
- Horinouchi, S., and B. Weisblum, 1980. Post-transcriptional modification of mRNA conformation: Mechanism that regulates erythromycin induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 7079-7098
- Iordanescu, S., 1977. Relationships between cotransducible plasmids in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **129**, 71-75
- Johnston, J.H., and M.H. Richmond, 1970. The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. *J. Gen. Microbiol.* **60**, 137-139
- Lai, C.-J., B. Weisblum, S.R. Fahnstock, and M. Nomura, 1973. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **74**, 67-72
- LeBlanc, D.J., and L.N. Lee, 1979. Rapid screening procedure for detection of plasmids in Streptococci. *J. Bacteriol.* **140**, 1112-1115
- Macrina, F. L., K.R. Jones, and P.H. Wood, 1980. Chimeric Streptococcal plasmids and their use as molecular cloning vehicles in *Streptococcus sanguis* (Challis). *J. Bacteriol.* **143**, 1425-1435
- Meyers, J.A., D. Sanches, L.P. Elwell, and S. Falkow, 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537
- Shivarkumar, A. G., J. Hahn, and D. Dubnau, 1979. Studies on the synthesis of plasmid-coded proteins and their control in *Bacillus subtilis* minicells. *Plasmid* **2**, 279-289

17. Wilson, C. R., and J. N. Baldwin, 1978. Characterization and construction of molecular cloning vehicles within *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **136**, 404-413
18. Wilson, C. R., S.E. Skinner, and W.V. Shaw, 1981. 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**, 245-258

(Received August 22, 1985)