

## 다제내성 황색포도상구균이 가지고 있는 테트라사이클린 내성 플라스미드의 동정

이대운 · 문경호\*  
경성대학교 약학대학

(Received September 5, 1994)

### Characterization of Tetracycline Resistance Plasmid of Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

Dae Woon Lee and Kyung Ho Moon\*

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

**Abstract**—The clinical isolate *Staphylococcus aureus* SA2 had four kinds of plasmids and was resistant to ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, methicillin, streptomycin, tetracycline and tobramycin. Transformation experiment demonstrated that 4.44 kb plasmid(pKH6) encoded resistance to tetracycline. The cleavage map of pKH6 was determined by restriction enzyme mapping techniques. The cleavage map is given for *EcoRV*, *HindIII*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI* and *XbaI*. Restriction endonucleases *BamHI*, *BglI*, *BglII*, *BstEII*, *EcoRI*, *HaeIII*, *PstI*, *PvuII*, *SalI*, *SmaI*, and *XhoI* have no site on this plasmid. The restriction map revealed extensive structural homology between pKH6 and pT181.

**Keywords** □ Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, protoplast transformation, tetracycline resistance plasmid, restriction map.

황색포도상구균에 있어서 테트라사이클린(Tc)내성에는 Inc3 incompatibility 계열에 속해있는 플라스미드들이 관련되어 있음이 알려져 있다.<sup>1)</sup> 위의 플라스미드들은 크기가 4.0~4.5 kb이며 세포 당 copy number가 20~50개인 multicopy 플라스미드인데<sup>2)</sup> 그중 몇개의 플라스미드에 대한 제한효소지도가 알려져 있으며<sup>3-5)</sup> 플라스미드 pT181은 염기배열순서가 결정되었다.<sup>6)</sup> 저자 등은 우리나라에서 분리한 Tc 내성 황색포도상구균으로부터 위의 계열과는 다른 크기가 큰 Tc 내성 플라스미드 pKH1을 분리 동정하여 보고한 바 있다.<sup>7)</sup> 한편 저자 등은 엠피실린, 클린다마이신, 콜로람페니콜, 에리스로마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 메치실린, 스트렙토마이신, 테트라사이클린, 토부라마이신 등 10개의 항생제에 대하여 내성을 보이는 *Staphylococcus aureus* SA2<sup>8)</sup>로부터 엠피실린, 클린다마이신, 에리스로마이신, 가나마이신, 스트렙

토마이신 내성을 매개하는 플라스미드 pKH2<sup>9)</sup>와 클로람페니콜 내성을 매개하는 플라스미드 pKH7<sup>10)</sup>을 분리 동정하였다. 본 논문에서는 동일 균주로부터 pT181 계열의 테트라사이클린 내성을 매개하는 플라스미드(pKH6)을 분리 동정하였기에 이에 보고하는 바이다.

#### 실험방법

**항생제**—엠피실린(Am)은 영진약품, 클로람페니콜(Cm), 에리스로마이신(Em), 스트렙토마이신(Sm), 옥시테트라사이클린(Tc)은 종근당, 클린다마이신(CI)은 한국업존, 메치실린(Mc)은 대한약품공업, 겐타마이신(Gm)은 동신제약, 가나마이신(Km)은 동아제약, 토부라마이신(Tm)은 대웅제약 제품을 시중에서 구입하여 사용하였으며 이중 Cm과 Em은 에탄올로 추출하여 사용하였다.

**배지**—황색포도상구균의 배양에는 Tryptic soy

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

broth(TSB)와 TSA(TSB+1.5% agar)를 사용하였으며 형질전환 시 재생배지로는 DM3를 사용하였다.<sup>7)</sup>

**실험균주**—형질전환을 위한 수용 균주로는 *Staphylococcus aureus* RN4220을 사용하였으며 내성균주로는 엠피실린, 클린다마이신, 클로람페니콜, 에리스로마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 메치실린, 스트렙토마이신, 테트라사이클린, 토부라마이신 등 10개의 항생제에 대하여 내성을 가지고 있는 *Staphylococcus aureus* SA2를 사용하였다.

**제한효소**—Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다.

**플라스미드 분리**—alkaline lysis법을 변형하여 사용하였다.<sup>7)</sup>

**형질전환**—Chang과 Cohen의 방법을 변형하여 사용하였다.<sup>7)</sup> *S. aureus* RN4220을 형질전환시킨 후에 내성균주를 선별할 때 top agar는 Tc을 200 µg/ml 농도로 함유한 HB/TSA 5 ml을 사용하였다.

**제한효소처리 및 전기영동**—*Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I을 사용하여 single digestion을 실시하였으며 이 중에서 *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Xba*I을 사용하여 double digestion을 실시하였다. 전기영동은 1.0% agarose gel을 사용하였으며 전압은 1 v/cm로, 완충용액은 TBE(pH 8.3, 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)를 사용하였다. EtBr로 염색하여 관찰하고 polaroid film type 667을 사용하여 사진을 찍었다. 전기영동 시에 molecular marker로는 *Hind*III-digested λ-DNA와 *Hind*III/*Eco*RI-double digested λ-DNA를 사용하였다.

## 결 과

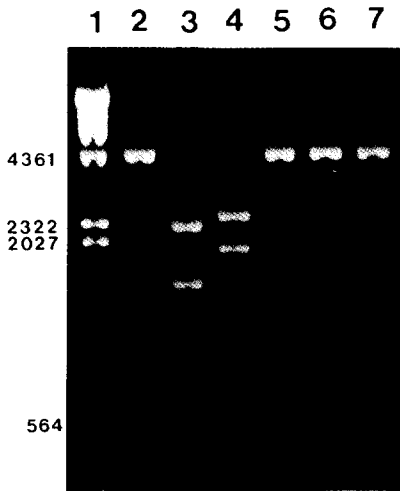
**형질전환**—항생제 다제내성을 갖고 있는 *S. aureus* SA2로부터 플라스미드를 분리하여 내성이 없는 *S. aureus* RN4220을 형질전환시키고 Tc을 함유하고 있는 배지에서 배양한 결과 Tc 내성을 보이는 *S. aureus* RN4220 형질전환체를 얻을 수 있었다. 이 형질전환체를 Tc이 50 µg/ml 들어있는 TSB에서 배양한 후 플라스미드를 분리하고 1.0% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 플라스미드 양상을 비교하였다 (Fig. 1). *S. aureus* SA2는 4개의 플라스미드를 가지고 있었는데 이중 아래에서 세번째의 플라스미드를 *S.*



Fig. 1—Agarose gel electrophoresis of rapidly isolated *S. aureus* plasmids. Lane 1, plasmids of *S. aureus* SA2; lane 2, supercoiled(SC) and open circular(OC) pKH6 of *S. aureus* KH6.

*aureus* RN4220 Tc내성 형질전환체에서 발견할 수 있었으며 따라서 이 플라스미드가 TC내성을 매개함을 알 수 있었다. 형질전환을 통하여 얻어진 *S. aureus* RN4220 Tc내성 형질전환체를 *S. aureus* KH6으로, 그리고 이 균주가 가지고 있는 Tc내성 플라스미드를 pKH6라 명명하였다. pKH6가 매개하는 다른 내성을 확인하기 위하여 *S. aureus* KH6을 Am(10 µg/ml), Cl(30 µg/ml), Cm(50 µg/ml), Em(50 µg/ml), Gm(50 µg/ml), Km(50 µg/ml), Mc(40 µg/ml), Sm(50 µg/ml), Tm(40 µg/ml)이 각각 함유된 TSB에서 배양한 결과 pKH6는 Tc 내성만을 매개하였다.

**제한효소지도**—*S. aureus* KH6을 *Bam*HI, *Bgl*II, *Bgl*II, *Bst*EII, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I으로 처리한 다음 전기영동을 실시하였다. *Eco*RV, *Hpa*II, *Kpn*I, *Xba*I은 한개의 제한효소부위를, *Hpa*I은 2개, *Hind*III는 3개의 제한효소부위를 가지고 있었으나 (Fig. 2) 다른 제한효소들은 제한효소부위를 가지고 있지 않았다. 제한효소지도를 작성하기 위하여 *Eco*RV, *Hind*III, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Xba*I을 조합하여 double digestion을 실시하고 전기영동한 다음(자료 사진생략) λ-DNA를 *Hind*III로 처리하거나 *Eco*RI과 *Hind*III로 double digestion하여 얻어진 조각을 mo



**Fig. 2**—Agarose gel electrophoresis of pKH6 digested with the restriction endonucleases. Lane 1,  $\lambda$ -DNA digested with *Hind*III; Lane 2, pKH6 digested with *Eco*RV; Lane 3, pKH6 digested with *Hind*III; Lane 4, pKH6 digested with *Hpa*I; Lane 5, pKH6 digested with *Hpa*II, Lane 6, pKH6 digested with *Kpn*I; Lane 7, pKH6 digested with *Xba*I. Fragment sizes(in b) are shown at left of gel.

lecular marker로 사용하여 각 조각들의 길이를 결정하였다(Table I, II). 이 조각들의 길이를 조합하여 제한효소지도를 작성하였으며 pKH6의 길이는 4.44 kb로 계산되었다(Fig. 3).

## 고찰

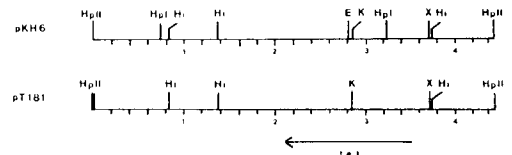
다제내성균으로부터 Tc내성을 매개하는 플라스미드 pKH6을 형질전환 실험을 통하여 동정하였다(Fig. 1). 제한효소지도를 작성하여 이미 알려진 다른 플라스미드들과 비교하여 보니 pKH6는 pT181과 거의 유사하였다(Fig. 3). 좀더 정확한 비교를 위하여 pKH6을 여러가지 제한효소로 처리하여 얻어진 조각들을 pBluescriptII KS에 클로닝하여 염기배열순서를 결정한 다음 pT181과 비교하여 보니 99% 이상의 homology가 있음을 확인할 수 있었다(논문 준비 중). 따라서 pKH6는 pT181와 거의 동일한 플라스미드임을 알 수가 있었다. 한편 Gillespie 등은 호주에서 Tc 내성 황색포도상구균으로부터 pT181과 동일한 플라스미드인 pSK52를 분리 보고했는데<sup>11)</sup> 이 플라

**Table I**—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced when subjecting pKH6 DNA to various restriction endonucleases

<i>Eco</i> RV	<i>Hind</i> III	<i>Hpa</i> I	<i>Hpa</i> II	<i>Kpn</i> I	<i>Xba</i> I
4.44	2.35	2.49	4.44	4.44	4.44
	1.53	1.95			
	0.56				

**Table II**—Experimental values(in kb) of DNA fragments produced by double digestion of pKH6 plasmid

Restriction endonucleases	sizes of fragments				
<i>Eco</i> RV + <i>Hind</i> III	1.53	1.44	0.91	0.56	
<i>Eco</i> RV + <i>Hpa</i> I	2.08	1.95	0.41		
<i>Eco</i> RV + <i>Hpa</i> II	2.81	1.63			
<i>Eco</i> RV + <i>Kpn</i> I	4.42	0.02			
<i>Eco</i> RV + <i>Xba</i> I	3.55	0.89			
<i>Hind</i> III + <i>Hpa</i> I	1.85	1.45	0.56	0.50	0.08
<i>Hind</i> III + <i>Hpa</i> II	2.35	0.81	0.72	0.56	
<i>Hind</i> III + <i>Kpn</i> I	1.53	1.46	0.89	0.56	
<i>Hind</i> III + <i>Xba</i> I	2.33	1.53	0.56	0.02	
<i>Hpa</i> I + <i>Hpa</i> II	2.49	1.22	0.73		
<i>Hpa</i> I + <i>Kpn</i> I	2.10	1.93	0.41		
<i>Hpa</i> I + <i>Xba</i> I	2.49	1.45	0.50		
<i>Hpa</i> II + <i>Kpn</i> I	2.83	1.61			
<i>Hpa</i> II + <i>Xba</i> I	3.70	0.74			
<i>Kpn</i> I + <i>Xba</i> I	3.57	0.87			



**Fig. 3**—Restriction maps of the staphylococcal Tc<sup>r</sup> plasmids pT181 and pKH6. Restriction sites are indicated by E(*Eco*RV), Hi(*Hind*III), HpI(*Hpa*I), HpII(*Hpa*II), K(*Kpn*I), X(*Xba*I). Map coordinate is expressed in kilobases.

스미드가 염색체에도 병합되어 있음을 확인하였다.<sup>12)</sup> 저자 등이 이전에 보고한 Tc 내성 플라스미드인 pKH1은 보통의 Tc내성플라스미드와는 크기가 다른 독특한 플라스미드였는데<sup>7)</sup> pSK52 처럼 pKH6가 다른 플라스미드에 병합되어 만들어졌을 가능성을 제시하여 준다. Tc 내성의 경우 *tet* 유전자가 내성과 관련되어 있음과 이 유전자가 2.35 kb *Hind*III 조각에 들어 있음이 밝혀져 있으므로(Fig. 3) pKH1과 pKH6로부터

2.35 kb *Hind*III 조각을 얻어 염기배열순서를 결정하여 본다면 보다 확실한 비교가 이루어질 것으로 사료된다.

## 문 헌

- 1) 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).
- 2) Lyon, B. R. and Skurray, R.: Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiological Rev.* **51**, 88-134 (1987).
- 3) Noguchi, N., Shishido, K., Ando, T. and Kono, M.: Construction and propagation of deletion derivatives of staphylococcal tetracycline-resistance plasmid pTP-5 in *Bacillus subtilis*. *Gene* **21**, 105-110 (1983).
- 4) Novick, R. P., Adler, G. K., Majumder, S., Khan, S. A., Carleton, S., Rosenblum, W. D. and Iordanescu.: Coding sequence for the pT181 *repC* product: a plasmid-coded protein uniquely required for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4108-4112 (1982).
- 5) Shafferman, A., Shalita, Z. and Hertman, I.: Cleavage maps of a tetracycline plasmid from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **134**, 345-348 (1978).
- 6) Khan, S. A. and Novick, R. P.: Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**, 251-259 (1983).
- 7) 김기현, 김종명, 문경호: 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. 약학회지 **36**, 255-258 (1992).
- 8) 강재선, 문경호: 황색포도상구균의 항생제 내성양상. 약학회지 **34**, 122-125 (1990).
- 9) 김기현, 이대운, 김종명, 문경호: 황색포도상구균의 항생제 다제내성을 갖는 플라스미드의 동정. 약학회지 **36**, 486-490 (1992).
- 10) 이대운, 문경호: 다제내성 황색포도상구균이 가지고 있는 클로람페니콜 내성 플라스미드의 동정. 약학회지 **37**, 621-624 (1993).
- 11) Gillespie, M. T., May, J. W. and Skurray, R. A.: Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated at an Australian hospital between 1946 and 1981. *J. Med. Microbiol.* **19**, 137-147 (1985).
- 12) 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).