

## 클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7의 Rep 단백질과 CAT 단백질의 염기서열 분석

송성준 · 이대운 · 김우구 · 신철교 · 임성환 · 문경호\*

경성대학교 약학대학

(Received October 26, 1995)

### Nucleotide Sequences of Rep and CAT Proteins encoded by Chloramphenicol-Resistance Plasmid pKH7

Sung Joon Yoon, Dae Woon Lee, Woo Koo Kim, Chul Kyo Shin,  
Sung Whan Im and Kyung Ho Moon\*

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

**Abstract**—The nucleotide sequence of *Xba*I-*Mbo*I fragment of pKH7, a chloramphenicol-resistant(Cm<sup>r</sup>) plasmid isolated from multidrug-resistant *S. aureus* SA2, has been determined. *Xba*I-*Mbo*I fragment of pKH7 was found to contain two ORFs. One ORF encoded Rep and the other encoded CAT protein. The deduced amino acid sequences of Rep and CAT of pKH7 were compared to those of pUB112 and pC221. Comparisons revealed that there was one amino acid difference in CAT between pKH7 and pUB112. CAT of pKH7 exhibited 98.6% amino acid identity to that of pC221. In case of Rep proteins, a slightly lower homology of 96.4% and 86.7% in amino acid sequences was observed between pKH7 and pUB112 and between pKH7 and pC221, respectively.

**Keywords** □ Chloramphenicol resistance plasmid, Nucleotide sequence, pKH7, pUB112, pC221, Rep protein, CAT protein.

클로람페니콜(Cm)은 50S ribosomal subunit와 결합함으로써 단백질 합성 과정 중 transpeptidation 단계를 방해하여 정균작용을 일으키는 항생제로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 황색포도상구균에 있어서 Cm에 대한 내성은 Cm이 chloramphenicol acetyl transferase(CAT)의 작용에 의하여 acetyl coenzyme A와 반응하여 아세틸화됨으로써 무독화되기 때문인 것으로 알려져 있는데 황색포도상구균의 경우 적어도 5 종류의 CAT이 있는 것으로 보고되었다.<sup>2,3)</sup>

황색포도상구균에 있어서 Cm 내성은 전적으로 크기가 2.9~5.1 kb의 multicopy 플라스미드 등에 의해서 매개된다.<sup>4-6)</sup> 이 플라스미드들은 DNA-DNA hy-

bridization 혹은 restriction endonuclease 분석에 의해서 3종류로 분류가 되는데 각각의 prototype은 pC221, pC223, pC194로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 현재까지 Gram 양성균과 Gram 음성균이 가지고 있는 13개의 *cat* 유전자의 염기배열이 결정되어 보고된 바 있다.<sup>10)</sup> 저자 등은 부산의 한 병원에서 분리한 항생제 다제내성균 *S. aureus* SA2로부터 Cm 내성을 매개하는 플라스미드 pKH7을 분리 동정하여 보고한 바 있는데<sup>11)</sup> 본 논문에서는 *cat* 유전자와 *rep* 유전자가 들어있는 pKH7의 *Xba*I-*Mbo*I 단편의 염기서열을 결정하고 다른 플라스미드와 비교한 결과를 보고하고자 한다.

#### 실험방법

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-628-6540

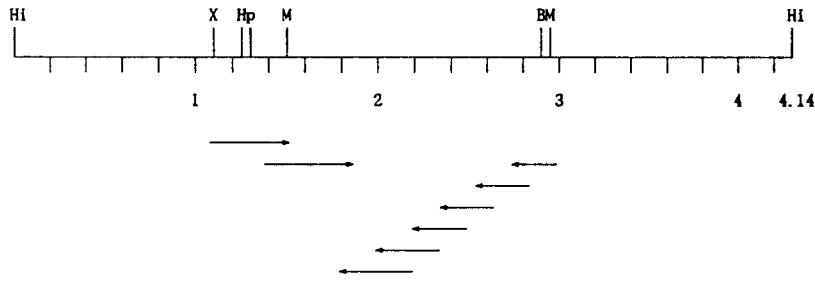


Fig. 1—Restriction maps and sequencing strategy of pKH7. Restriction sites are indicated by B(*Bst*EII), Hi (*Hind*III), Hp(*Hpa*II), M(*Mbo*I), and X(*Xba*I). Map coordinate is expressed in kb.

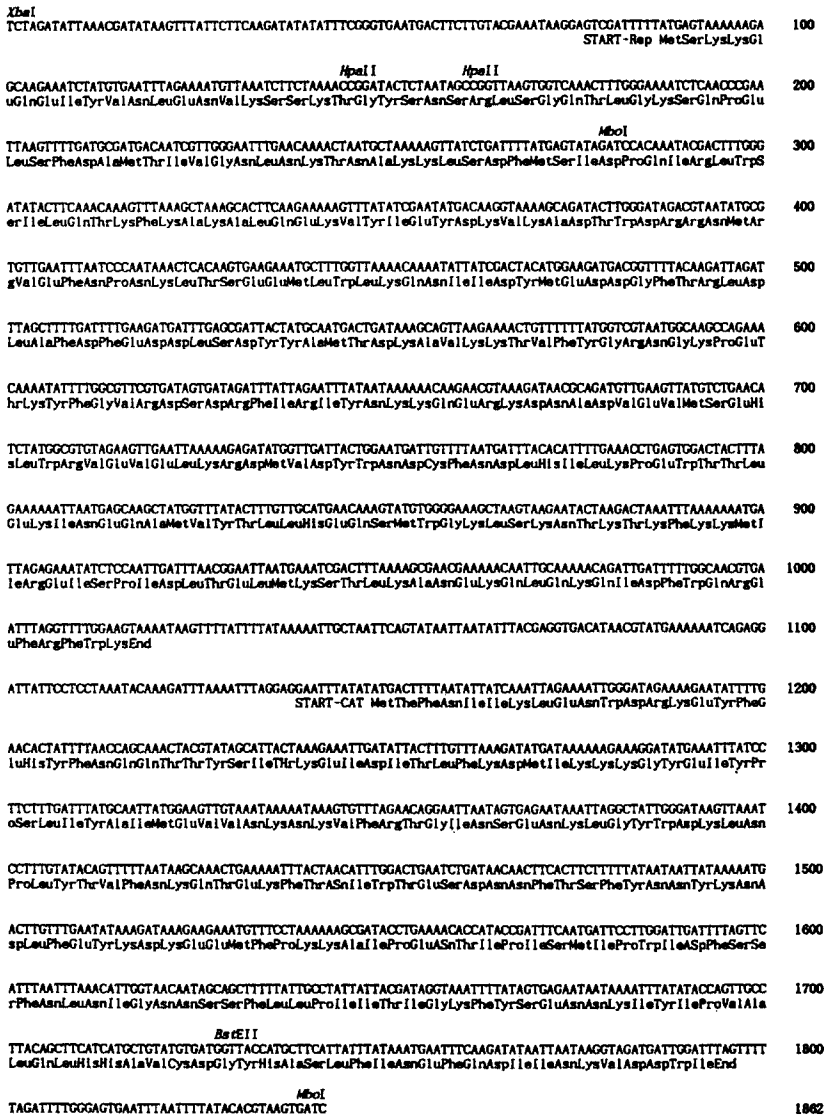


Fig. 2—Nucleotide sequence of the *Xba*I-*Mbo*I fragment of pKH7. The amino acid sequences of Rep and CAT proteins are shown.

pKH7은 *S. aureus* KH7<sup>11)</sup>으로부터 분리하여 사용하였으며 Phagemid인 pBluescriptII KS<sup>+</sup>를 클로닝 및 염기서열 결정 vector로 사용하였다. 클로닝 및 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 수용균주로는 *E. coli* JM83(*ara*,  $\Delta$ (*lac*, *proA*, *B*), *rps*, *strA*, *thi*,  $\phi$  80 *dlacZ* M15(*rk*<sup>+</sup>, *mk*<sup>+</sup>))을 사용하였다.

**효소 및 시약** - 여러가지 제한효소나 T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 Wizard<sup>TM</sup> DNA purification systems, 결실돌연변이를 위한 Erase-a-Base<sup>®</sup> system 그리고 염기서열 결정을 위한 SILVER SEQUENCE<sup>TM</sup> DNA Sequencing systems, T3 promotor primer 및 T7 promotor primer를 Promega에서 구입하여 사용하였다.

**Plasmid 분리** - *S. aureus* KH7로부터 pKH7의 분리는 김<sup>12)</sup> 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다.<sup>13)</sup> DNA의 결실이나 염기서열 결정을 위한 플라스미드는 Wizard<sup>TM</sup> DNA purification systems을 사용하여 분리하였다.

**결실돌연변이체의 생성** - 염기서열 결정을 위한 Unidirectional nested deletion mutant는 Erase-a-Base<sup>®</sup> system을 사용하여 제조자의 방법에 따라 만들

었다. 결실 돌연변이체 중에서 원하는 크기의 플라스미드를 가지고 있는 균주들을 얻기 위하여 돌연변이체의 플라스미드를 분리한 다음 전기영동하여 선별하였다.

**클로닝 및 염기서열 결정** - pKH7 전체 혹은 단편들을 pBluescriptII KS<sup>+</sup>에 클로닝하기 위하여 pKH7을 *Xba*I, *Mbo*I으로 처리하였으며 pBluescriptII KS<sup>+</sup>는 동일한 제한효소를 사용하거나 *Mbo*I의 경우에는 compatible end를 만드는 *Bam*HI으로 처리하였다. 처리된 단편들을 T4 DNA ligase를 사용하여 연결하였으며 *E. coli* JM83에 CaCl<sub>2</sub>법<sup>14)</sup>으로 형질전환시켜 염기서열 결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 SILVER SEQUENCE<sup>TM</sup> DNA Sequencing systems을 사용한 Sanger 법에 의하여 수행하였다.<sup>15)</sup>

**염기서열 분석** - 염기서열을 결정한 다음 이미 서열이 밝혀진 플라스미드와의 아미노산 서열 비교는 WWW 인터넷을 통하여 NCBI의 BLAST를 이용하여 수행하였다.<sup>16)</sup>

## 결과 및 고찰

pKH7의 제한효소지도와 *Xba*I-*Mbo*I 단편의 염기서열 결정 모식도가 Fig. 1에 나와 있다. 먼저 pKH7과

	*****	***** *	
pKH7	MSKKEQEIVYVLENV KSSKTGYNSRSLSGQTLGKSQPELSFDAMTIVGNLKNKNAKCLSD		60
pUB112	MSKKEQRIIFSMLNV NFVKTGYNSRSLSGQTLGKSQPKLSFDAMTIVGNLKNKNAKCLSD		
pC221	MSTENHSNLFHNKDLDNFSKTYGYSNSRSLSGNFTTTPQPELSFDAMTIVGNLKNKNAKCLSD		
	**	*	*
pKH7	FMSIDPQIRLWSILQTKFKAKALQEKVYI EYDKVKADTWRDRNRVFEFNPNTLSEEMLW		120
pUB112	FMSVDPQIRLWSILQTKFKAKALQEKVYI EYDKVKADTWRDRNRVFEFNPNTLSEEMLW		
pC221	FMSTFPQIRLWSILQTKFKAKALQEKVYI EYDKVKADSWDRDRNRVFEFNPNTLTHEEMLW		
		*	
pKH7	LKQNIIDYMEDDGFTRLDLAFDFEDDLSDYAMTDKAVKKTIFYGRNGKPETKYFGVRDS		180
pUB112	LKQNIIDYMEDDGFTRLDLAFDFEDDLSDYAMTDKAVKKTIFYGRNGKPETKYFGVRDS		
pC221	LKQNIIDYMEDDGFTRLDLAFDFEDDLSDYAMTDKAVKKTIFYGRNGKPETKYFGVRDS		
		* * * * *	
pKH7	DRFIRIYNKKQERKINADVEVMSEHLWRVEVELKRDMDVYWNDCFNDLHLIKPFWTTLEK		240
pUB112	DRFIRIYNKKQERKINADVEVMSEHLWRVEIELKRDMDVYWNDCFNDLHLIKPFWTTLEK		
pC221	DRFIRIYNKKQERKINADVEVMSEHLWRVEIELKRDMDVYWNDCFDDLHLIKPFWTTPEK		
	**	* * * * *	*
pKH7	INEQAMVYTLHEQSMWGLSKNTKTKFKMIREISPIDLTELMKSTLKANEQQLQKQID		300
pUB112	INEQAMVYTLHEESMWGLSKNTKTKFKMIREISPIDLTELMKSTLKENEQQLQKQID		
pC221	VKEQAMVYLLNNEEGTWGLERHAKYKYKLIKEISPIDLTELMKSTLKENEQQLQKQID		
pKH7	FWQREFRFWK		310
pUB112	FWQREFRFWK		
pC221	FWQREFRFWK		

Fig. 3— Aligned Rep proteins from pKH7, pUB112, and pC221. Different amino acid sequences are indicated by asterisk.

pKH7	MTFNI IKLENWDRKEYFEHYFNQTTYSITKE IDITL FKDMIKKKGYE IYPSLIYAIMEV	60
pUB112	MTFNI IKLENWDRKEYFEHYFNQTTYSITKE IDITL FKDMIKKKGYE IYPSLIYAIMEV	
pC221	MTFNI IKLENWDRKEYFEHYFNQTTYSITKE IDITL FKDMIKKKGYE IYPLSIYAIMEV	
	*	
pKH7	VNKNKVFRTG INSENKLG YWEKLNPLYTVFNKQTEKFTNI WTESDNNFTSFYNNKNDLF	120
pUB112	VNKNKVFRTG INSENKLG YWDKLNPLYTVFNKQTEKFTNI WTESDNNFTSFYNNKNDLF	
pC221	VNKNKVFRTG INSENKLG YWDKLNPLYTVFNKQTEKFTNI WTESDNNFTSFYNNKNDLL	
	*	
pKH7	EYKDKEEMFPKKAIPENTIPISMIPWIDFSSFNLNIGNSSFLLP IITIGKFYSENNKIY	180
pUB112	EYKDKEEMFPKPIPENTIPISMIPWIDFSSFNLNIGNSSFLLP IITIGKFYSENNKIY	
pC221	EYKDKEEMFPKPIPENTIPISMIPWIDFSSFNLNIGNSNFLLP IITIGKFYSENNKIY	
	*	
pKH7	IPVALQLHHA VCDGYHASLFIN EFQDI INKVDDWI	215
pUB112	IPVALQLHHA VCDGYHASLFIN EFQDI INKVDDWI	
pC221	IPVALQLHHA VCDGYHASLFMNEFQDI IHKVDDWI	

Fig. 4— Aligned CAT proteins from pKH7, pUB112, and pC221. Different amino acid sequences are indicated by asterisk.

pBluescriptII KS<sup>+</sup>를 *Xba*I로 처리한 다음 연결시켜 염기서열을 결정하였고 *Mbo*I 단편의 경우에는 pKH7은 *Mbo*I로 pBluescriptII KS<sup>+</sup>는 *Bam*HI로 처리한 다음 연결하여 염기서열을 결정하였으며 연결이 안된 부분은 결실돌연변이체를 만들어 염기서열을 결정하여 전체 염기서열을 완성하였다(Fig. 2). pKH7의 *Xba*I-*Mbo*I 단편에는 두개의 ORF가 있었는데 하나는 DNA 복제에 관여하는 replication initiator(Rep) 단백질이며 다른 하나는 Cm 내성에 관여하는 CAT 단백질이었다. pKH7의 Rep 단백질은 309개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 CAT 단백질은 215개의 아미노산으로 구성되어 있었다. Cm 내성을 매개하는 플라스미드는 크게 3종류로 구분이 되는데 각각의 prototype은 pC221, pC223, pC194으로 알려져 있다.<sup>9)</sup> 본 연구에 사용된 pKH7은 제한효소지도를 작성하여 비교한 결과 pC221 계열의 플라스미드임이 확인되었으며 정확하게는 pC221 계열의 pUB112와 아주 유사하므로<sup>11)</sup> pKH7의 Rep과 CAT 단백질의 아미노산 서열을 pUB112와 pC221의 Rep 단백질과 CAT 단백질의 아미노산 서열과 비교해 보았다(Fig. 3, Fig. 4). Rep 단백질의 경우 pKH7은 pUB112와 96.4%의 상동성을 보였으며 pC221에 대하여는 86.7%의 상동성을 보였는데 특히 N 말단 쪽에서 현저한 차이를 나타내었다. CAT 단백질의 경우 pKH7은 pUB112와 1개의 아미노산에서 차이를 보여 100%에 가까운 상동성을 보였으며 pC221에 대해서는 98.6%의 상동성을 보였다. 따라서 Rep과 CAT 두개의 단백질 중에서 CAT 단백질에서 더 많은 유사성이 있

음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 항생제 다제내성균 *S. aureus* SA2에서 분리 동정된 pKH7은 pUB112와는 유사하지만 동일하지 않은 플라스미드임을 알 수 있었다.

pKH7의 *Xba*I-*Mbo*I 단편의 염기서열은 NCBI(USA)의 Genbank에 accession no. U38429로 등록되었음.

## 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) Schwarz, S. and Cardoso, M.: Nucleotide sequence and phylogeny of a chloramphenicol acetyltransferase encoded by the plasmid pSCS7 from *Staphylococcus aureus*. *Antimicro. Agents Chemother.* **35**, 1551 (1991).
  - 11) 이대운, 문경호 : 다제내성 황색포도상구균이 가지고 있는 클로람페니콜 내성 플라스미드의 동정. 약학회지, **37**, 621 (1993).
  - 12) 김종명, 김기현, 문경호 : 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. 약학회지, **36**, 255 (1992).
  - 13) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 368.
  - 14) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 250 (1982).
  - 15) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463 (1977).
  - 16) 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).