

항생제 다제내성균 *Staphylococcus aureus* SA2로부터 분리한 테트라사이클린 내성 플라스미드 pKH6의 염기서열

이대운 · 윤성준 · 김우구 · 신철교 · 임성환 · 이백락¹ · 문경호*
경성대학교 약학과, ¹인제대학교 미생물학과

Complete Nucleotide Sequence of pKH6, a Tetracycline-Resistance Plasmid from Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* SA2. Dae-Woon Lee, Sung-Joon Yoon, Woo-Koo Kim, Chul-Kyo Shin, Sung-Hwan Im, Baek-Rak Lee¹ and Kyung-Ho Moon*. College of Pharmacy, Kyungsoong University, 110-1, Daeyon-dong, Nam-gu, Pusan 608-736, Korea, ¹Department of Microbiology, Injae University, Kimhae 621-749, Korea — The complete nucleotide sequence of pKH6, a tetracycline-resistance (Tc^r) plasmid isolated from multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* SA2, has been determined and compared with that of the staphylococcal Tc^r plasmid pT181. The nucleotide sequences of the two plasmids are in agreement except for 7 nucleotides. All differences are caused by base pair substitutions. Among 6 substitutions, 3 occurred in coding regions. However, only two base substitutions in coding regions resulted in changes of amino acid sequences in two different ORFs of repC and Pre proteins.

테트라사이클린(Tc) 내성을 매개하는 플라스미드 중에서 가장 대표적인 플라스미드는 pT181로 알려져 있는데 이 플라스미드는 1982년 Khan(1) 등에 의해서 처음으로 전체 염기서열이 결정되어 보고되었다. 이들의 결과에 의하면 pT181에는 세개의 ORF가 존재하며 이 들로부터 세개의 단백질이 생성되는데 그 중에서 RepC 단백질은 플라스미드의 복제에, Pre 단백질은 플라스미드의 재조합에 관여하며 Tet 단백질은 Tc 내성에 관여한다고 알려져 있다. pT181과 유사한 플라스미드 들이 여러나라에서 발견되어 보고되었으며(2, 3) 한국 에서도 저자들에 의해서 보고되었다(4). 본 논문에서는 한국에서 발견된 Tc 내성 플라스미드 pKH6의 전체 염기서열과 이 서열을 pT181과 비교한 결과를 보고하 고자 한다.

재료 및 방법

플라스미드 및 실험균주

Tc 내성 플라스미드 pKH6는 *S. aureus* KH6(4)로부터 분리하여 사용하였으며 phagemid인 pBluescript II KS⁺를 클로닝 및 염기서열 결정 벡터로 사용하였다. 클로닝 및 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 수용균주로는 *E. coli* JM83[ara, Δ(lac, proA, B), rps, strA, thi, ϕ80dlacZ M15(rk⁺, mk⁺)]을 사용하였다.

효소 및 시약

*Corresponding author.

Key words: *Staphylococcus aureus* SA2, tetracycline-resistance plasmid, complete nucleotide sequence, pKH6, pT181

여러가지 제한효소나 T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 WizardTM DNA purification systems, 결실돌연변이를 위한 Erase-a-Base[®] system 그리고 염기서열 결정을 위한 SILVER SEQUENCETM DNA sequencing systems, T3 promotor primer 및 T7 promotor primer를 Promega에서 구입하여 사용하였다.

플라스미드 분리

S. aureus KH6로부터 pKH6의 분리는 김(5) 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다(6). DNA 결실이나 염기서열 결정을 위한 플라스미드 분리는 WizardTM DNA purification systems을 사용하여 분리하였다.

결실돌연변이체의 생성

염기서열 결정을 위한 결실돌연변이체는 Erase-a-Base[®] system을 사용하여 제조자의 방법에 따라 만들었다. 결실돌연변이체 중에서 원하는 크기의 플라스미드를 가지고 있는 균주들을 얻기 위하여 결실돌연변이체의 플라스미드를 분리한 다음 전기영동하여 선별하였다.

클로닝 및 염기서열 결정

pKH6의 전부 혹은 단편들을 pBluescript II KS⁺에 클로닝하기 위하여 pKH6를 HindIII, HpaI, HpaII 그리고 KpnI으로 처리하였으며 pBluescript II KS⁺는 동일한 제한효소를 사용하거나 compatible end를 만드는 제한효소로 처리하였다. 처리된 단편들은 T4 DNA ligase를 사용하여 연결하였으며 *E. coli* JM83에 CaCl₂

법으로 형질전환시켜(7) 염기서열 결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 SILVER SEQUENCE™ DNA sequencing systems을 사용한 Sanger법에 의하여 수행하였다(8).

염기서열을 결정한 다음 이미 서열이 밝혀진 플라즈미드와의 염기서열 비교는 WWW 인터넷을 통하여 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 수행하였다(9).

결과 및 고찰

염기서열 분석

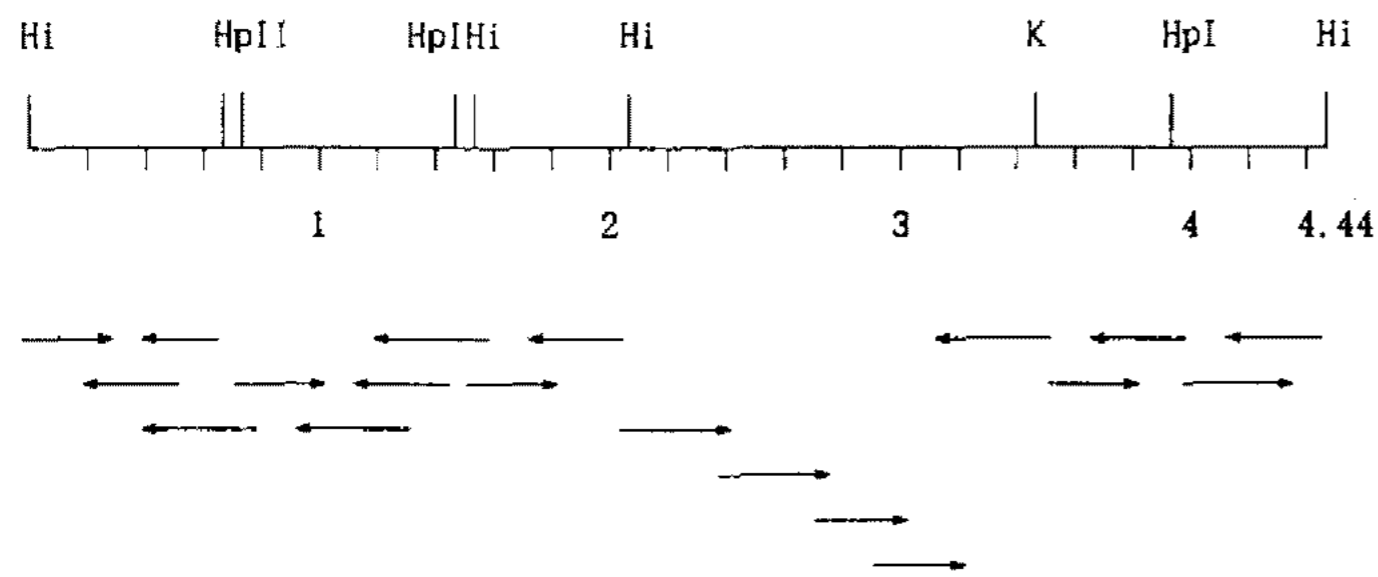


Fig. 1. Restriction maps and sequencing strategy of pKH6. Restriction sites are indicated by Hi (*HindIII*), HpI (*HpaI*), HpII (*HpaII*), and K (*KpnI*). Map coordinate is expressed in kilobases.

pKH6의 전체 염기서열 결정 모식도가 Fig. 1에 나와 있다. pKH6를 *HindIII*, *HpaI*, *HpaII* 그리고 *KpnI*으로 처리하여 단편을 만든 다음 pBluescript II KS⁺에 연결하여 염기서열을 결정하였다. 특별히 *HindIII*의 경우에는 complete digestion 뿐만 아니라 partial digestion을 시켜 하나의 단편이 만들어지게 한 다음 pBluescript II KS⁺에 연결시킨 후 염기서열을 결정하여 3개의 *HindIII* 단편의 연결 방향을 결정하였다. Fig. 2에 나와 있듯이 pKH6의 전체 길이는 4439 bp로 나타났는데 이것은 restriction enzyme mapping technique을 사용하여 구한 pKH6의 길이 4.44 kb(4)와 아주 잘 맞음을 알 수 있었다.

pKH6의 염기서열과 pT181의 염기서열을 비교한 결



Fig. 2. Complete nucleotide sequence of pKH6 DNA.

The amino acid sequences of RepC, Tet, and Pre proteins are shown. Nucleotides and amino acids in pT181 that are different from those in pKH6 are shown above and below the sequence of pKH6, respectively.

과 7개의 염기에서 차이를 나타냈는데 전부 다 염기쌍이 치환된 형태였다. 4개의 염기쌍 치환은 noncoding 부위에서 일어났기 때문에 아미노산 서열에는 영향을 주지 않았으며 coding 부위에서 일어난 것 중에서도 1개는 동일한 아미노산을 coding 하였다. pKH6와 pT181 둘 다 3개의 ORF를 가지고 있었는데 하나는 테트라사이클린 내성에 관여하는 Tet 단백질을 다른 하나는 플라스미드 복제에 관여하는 RepC 단백질을 그리고 나머지 하나는 플라스미드의 재조합에 관여하는 Pre 단백질을 만들어 내는데 특히 Tet 단백질의 경우에는 시작 개시 코돈이 TTG로써 *S. aureus*의 경우에 잘 알려져 있다(10). pKH6과 pT181의 경우에는 위의 염기쌍 서열 차이로 인하여 RepC와 Pre 단백질에 있어 각각 한개씩의 아미노산 서열에서 차이를 나타내었다. pKH6과 pT181의 염기서열 차이와 이로 인한 아미노산 서열 차이는 두가지 측면을 고려해 볼 수가 있는데 지역적 차이에서 오는 일반적 현상인 점돌연변이가 첫 번째 가능성이며 또한 pT181의 경우 염기서열 결정이 잘못되어 있을 가능성도 배제할 수 없는데 이것은 pT181의 경우 처음에 결정된 염기서열이 잘못되어 부분적으로 3번에 걸쳐 수정이 되었기 때문이다(11-13). 한편 Noguchi(14) 등은 Tc 내성 플라스미드인 pTP5를 HindIII로 처리한 다음 다시 재조합시켜 pTP5의 3개의 HindIII 단편 중에서 가장 작은 단편인 560 bp 단편이 결실된 형태의 플라스미드 pNS1을 만들어 염기서열을 결정하였는데(15) 이 염기서열과 pKH6의 염기서열은 염기서열을 비교할 수 없는 560 bp 단편을 제외하고는 100% 동일하였다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 다제내성균 *S. aureus* SA2에서 분리한 pKH6는 다른 나라에서 발견되는 Tc 내성 플라스미드와 유사하거나 동일한 플라스미드임을 알 수 있었다. pT181 같은 Tc 내성 플라스미드들은 염색체(16)나 혹은 다른 플라스미드(17)에 병합된다고 알려져 있으므로 염기서열이 밝혀진 Tc 내성 플라스미드 pKH6는 한국에서 Tc 내성 플라스미드의 전파 경로를 이해하는데 도움을 주리라 사료된다.

pKH6의 전체 염기서열은 NCBI(USA)의 GenBank에 accession no. U38428로 등록되었음.

요 약

한국에서 임상균주로부터 분리한 테트라사이클린(Tc) 내성 플라스미드 pKH6의 전체 염기서열을 결정하여 가장 대표적인 Tc 내성 플라스미드인 pT181과 비교하였다. pKH6의 전체 길이는 4439 bp로 pT181과 동일하게 나타났으며 염기서열은 7개의 염기에서 차이를 보였다. 전부 다 염기쌍이 치환된 형태로 나타났으며 그 중 3개는 coding 부위에서 일어났다. coding 부위에서 일어난 경우에도 1개는 동일한 아미노산을 coding

하였기 때문에 pT181과 차이가 없었으며 RepC와 Pre 단백질에 있어 각각 1개의 아미노산에서 차이를 나타내었다.

참고문헌

1. Khan, S.A. and R.P. Novick. 1983. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**: 251-259.
2. Kono, M., M. Sasatsu, and H. Hamashima. 1978. Transformation of *Bacillus subtilis* with staphylococcal plasmid DNA. *Microbiol. Lett.* **5**: 55-59.
3. Gillespie, M.T., J.W. May, and R.A. Skurray. 1985. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated at an Australian hospital between 1946 and 1981. *J. Med. Microbiol.* **19**: 137-147.
4. 이대운, 문경호. 1995. 다제내성 황색포도상구균이 가지고 있는 테트라사이클린 내성 플라스미드의 동정. *약학회지* **39**: 6-9.
5. 김기현, 김종명, 문경호. 1992. 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. *약학회지* **36**: 255-258.
6. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 368-369.
7. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. Pp. 250-251.
8. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
9. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basis local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
10. McLaughlin, J.R., C.L. Murray, and J.C. Rabinowitz. 1981. Unique features in the ribosome binding site sequence of the Gram-positive *Staphylococcus aureus* β -lactamase gene. *J. Biol. Chem.* **256**: 11283-11291.
11. Gennaro, M.L., J. Kornblum, and R.P. Novick. 1987. A site-specific recombination function in *Staphylococcus aureus* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**: 2601-2610.
12. Mojumdar, M. and S.A. Khan. 1988. Characterization of the tetracycline resistance gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**: 5522-5528.
13. Guay, G.G., S.A. Khan, and D.M. Rothstein. 1993. The *ter(K)* gene of pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. *Plasmid* **30**: 163-166.
14. Noguchi, N., K. Shishido, T. Ando, and M. Kono. 1983. Construction and propagation of deletion derivatives of staphylococcal tetracycline-resistance plasmid pTP5 in *Bacillus subtilis*. *Gene* **21**: 105-110.
15. Noguchi, N., T. Aoki, M. Sasatsu, M. Kono, K. Shishido, and T. Ando. 1986. Determination of the complete nucleotide sequence of pNS1, a staphylococcal tetracycline-resistance plasmid propagated in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **37**: 283-288.

16. Gillespie, M.T., J.W. May, and R.A. Skurray. 1986. Detection of an integrated tetracycline resistance plasmid in the chromosome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1723-1728.
17. Novick, R.P., S.J. Projan, W. Rosenblum, and I. Edelman. 1984. *Staphylococcal plasmid* cointegrates are formed by host- and phage-mediated general *rec* systems that act on short regions of homology. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 374-377.

(Received 18 January 1996)