

최 종
연구보고서

우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정
유전자의 특성 분석
(Characterization of the antibiotics resistant determining
genes carried by aquatic bacteria in Korea)

부경대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 9 월 13 일

주관연구기관명 : 부경대학교

주관연구책임자 : 정현도

요 약 문

I. 제 목

우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 최종 목적

해산어와 관상어의 *Vibrio* spp., *Edwardsiella tarda*, 그리고 Enteric bacteria를 대상으로 하여 Pc, QN 그리고 Tc에 대한 내성 유전자의 분석 → 향후 내성균의 내성 수준 증가, 전이속도, 수입 이식어의 위험성, 그리고 새로운 내성 유전자 발생에 대한 경보 체계구축과 과학적 수산물 검사를 위한 data 축적.

2. 목적의 선정 사유

어류에 발생하는 질병의 원인 균은 대개 그람 음성균이 차지하고 있다. 이중 가장 빈도가 높게 나타나는 균은 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp. 그리고 *Enterobacter* 계열의 세균이 해수와 담수에 대표적으로 문제시 되고 있으므로 이들 균에서 나타나는 내성균들의 발생 비율에 대한 연구는 이미 상당히 되어 있다. 그러므로 우리나라의 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp. 그리고 *Enterobacter* 계열의 세균이 내성균이 함유하고 있는 유전자의 발현과 특성을 분석하고 동시에 새로운 유전자의 screening 과 cloning을 통하여 다양한 내성 유전자의 database 화를 기하고자 한다.

3. 연구개발의 필요성

현재 사용되고 있는 항생제에 대한 내성은 어느 정도의 문제점을 가지고 있는지에 대한 분석이 이루어져야 할 것이나 현재 우리나라는 가상적이고 포괄적인 관점에서의 내성균 위험도 분석은 이루어지고 있지만, 각 내성균이 가지고 있는 내성 유전자의 특성 분석과 비교에 의한 구체적인 위험도 분석이 이루어지고 있다고 보기는 어려운 실정이다. 더구나 외국으로 부터의 수입에 제한이 없고 항생제 사용에 대한 어떤 규제도 없는 관상어 등에서 내성균 발생과 그 특성에 대한 분석은 현재 시급히 그 실태 분석이 이루어져야 할 것이다.

세계각국에서 가장 많이 사용되는 항생제중 Tc에 대한 내성 유전자는 33종 이상, ampicillin에 내성을 나타내는 β -lactamase 유전자는 200종 이상, 그리고 quinolone 내성 유전자 변이는 각 지역별 또는 strain 별로 독특하게 mutation들이 나타나는 것으로 알려져 있으며 이들 내성 유전자들은 제각기 다른 특성 (내성특성, 복제 수, 다른 균에로의 전이성 등)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러므로 단순히 MIC 값 등 보다는 수산생물에서 나타나는 내성균이 가지고 있는 내성유전자는 어떠한 종류이며, 최근 다른 나라에서 나타나고 type의 유전자가 우리나라에 이식 되어 왔는지, genomic DNA상에서의 위치는 어디이며, 그것들의 전달 기작은 Tn 인지 plasmid 인지 또는 단순한 chromosomal mutation인지에 대한 조사가 충분히 이루어져 있어야 그 위험도와 경보체계 확립을 위한 정확한 결론을 얻을 수 있을 것이다.

그리고 우리나라에는 중국과 일본으로부터 많은 활어가 수입되고 있으므로 이 두 나라로부터 수입된 활어 장내세균에서 나타나는 내성 유전자 종류 및 특성에 대한 분석은 향후의 무역분쟁 또는 수입 금지책 마련을 위하여서라도 필히 이루어지고 지속적인 monitoring 이 있어야 할 것이다.

이러한 연구는 해양 생물종자의 은행화, 수산생물의 원산지 판명 연구, 어류질병의 진단법 개발 등과 동시에 실시되어야 할 분야일 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 본 연구에서는 *E. tarda*, *Vibrio* spp. 그리고 *Enterobacter* 계열의 세균에 대하여 :

a) 양식현장이나 병어 그리고 (수입)관상어로부터 직접 내성균을 분리해내고, 여러 항생제에 대한 내성정도의 결정에 의한 내성수준의 분포를 분석함으로써 내성 문제의 심각성을 조사하였다.

b) Tc 내성균은 어떠한 내성 결정 유전자를 가지고 있는지에 대한 분포를 현재까지 알려져 있는 32 종의 Tc 내성 유전자 중 그람 음성균에서 가장 많이 나타나고 그래서 중요한 9 종의 유전자 (A, B, C, D, E, G, K, L, M)를 중심으로 하여 분석 하였다.

c) *E. tarda*의 quinolone 내성 내성 관련 유전자중 *parC*, *parE*, *gyrB*의 유전자를 새롭게 cloning 하고 내성균에서의 QRDR (quinolone resistant determining region)의 변화를 분석하여 quinolone 계열의 항생물질에 대한 내성 변이 속도와 특성의 진화를 분석 한다. 이것은 *in vitro* mutant 와 현장 isolate의 비교 연구를 통하여 보다 구체적으로 분석 하였다.

d) 현재까지 외국에서 연구가 매우 힘들게 진행되고 있는 *Vibrio* 균이 함유하고 있는 내성유전자에 대한 분석을 시도 하고, detection이 잘 되지 않으면 새로운 type의 *bla* gene을 screening 하여 그 특성을 분석 하였다.

e) 수입 해산어 및 관상어에서의 Tc 내성균 분석과 유전자 분석을 통하여 새로운 내성유전자의 이입이 되고 있는지 그리고 그 위험성은 어떠한지를 분석 하였다.

IV. 연구개발 결과

1. *Vibrio* spp.와 *E. tarda*의 β -lactamase

다양한 bla gene에 대한 primer를 이용하여 PCR을 실시한 결과 1997년부터 2003년까지의 한국내 penicillin resistant *Vibrio* spp. 36에서 모두 negative 결과를 보여 주었다. 새로운 bla gene의 cloning에서 우리는 *Vibrio alginolyticus* KV-3 로부터 bla VAK-1을 얻을 수 있었다. 이 유전자의 존재를 1997년으로부터 분리된 penicillin 내성의 36 strains 에 대하여 PCR 분석을 실시하여 한국 내 spreading에 대한 추측을 할 수 있게 하였다. 이 유전자는 nonmobile로, chromosome에 존재하는 것으로 확인되었으며 Phylogenetic analysis에서 class A에 속하였다.

*Edwardsiella tarda*의 penicillin 내성 유전자 특성 분석을 위하여 1993년부터 2003년까지 동해안, 남해안, 제주 등지에 위치한 양어장의 병어에서 115 개의 내성균을 분리 하였고 이 중 12개의 균주가 ampicillin에 $256\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 나타내었다. 분석 결과 ampicillin에 내성을 나타내는 *Edwardsiella tarda*에서의 β -lactam 계열 항균제 MIC 값은 penicillin 계열에서는 매우 높게 나타났지만 cephalosporins 계열에서는 상대적으로 낮은 MIC 값을 나타내었다. 이것은 *E. tarda*에서의 ESBL gene은 아직 존재하지 않는다는 것을 의미하며 광범위 β -lactam 항균제가 훌륭한 치료제가 될 수 있음을 암시한다.

또한 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda* 중에서 10개에서 TEM-1 gene이 확인 되었다. TEM-1 gene이 확인된 10개 균주 중 8개 균주에서 transformant가 확인 되었다. 이것으로 TEM-1 gene이 이동성이 있는 plasmid에 존재 하는 것을 알 수 있으며 양식 어장에서 ampicillin에 내성을 나타내는 *E. tarda*가 발생 할 때 빠른 시간 내에 내성균의 비율이 증가 될 수 있음을 예상 할 수 있다. 그리고 TEM gene의 promoter에는 P3, Pa/Pb, P4, P5 등 4가지 형태 가 있다고 알려져 있는데 이것은 promoter 부위의 nucleotide가 한 개 내지

두개가 변화 하여 생긴 것으로 P3가 가장 약하고 P5가 가장 강력한 promoter로 알려져 있다. 본 연구에서 *E. tarda*에 확인된 TEM-1 gene은 모두 P3의 약한 promoter를 가지고 있어 그 내성 level의 위험성 정도는 비교적 완화된 형태로 존재함을 확인 하였다. 그러므로 본 part에서의 결론은 우리나라 Pe 내성균은 아직 유전적 측면에서 매우 위험한 level로까지 진화하였다고 보기는 어렵다고 할 수 있다.

2. *Edwardsiella tarda*의 quinolone 내성 관련 유전자들

*E. tarda*의 quinolone 내성 획득의 원인을 분석하기 위하여 여러 균들의 *gyrA*, B gene을 비교하여 degenerated primer를 제작하였고 이 primer를 이용한 PCR로 QRDR의 염기서열을 결정하였으며, cassette ligation-mediated PCR법으로 *gyrA*와 B의 전체 염기서열을 결정할 수 있었다. 또한 *parC*와 *parE*에 대한 모든 유전적 정보도 획득 하였다. 이렇게 결정된 *gyrA* gene을 바탕으로 1994년부터 2003년까지 우리나라 양어장의 감염어로부터 분리된 *E. tarda*의 QRDR을 분석한 결과 83번 아미노산의 변이를 확인 할 수 있었으며, 인위적인 실험에 의해서 획득된 내성균에서는 87번 아미노산의 변이를 확인할 수 있었다. 이는 *E. coli*를 포함하는 다수 그람 음성균과 같은 결과로 GyrA의 83, 87번 아미노산의 변이가 quinolone 내성 획득에 주요한 원인 중의 하나임을 알 수 있었다. 결론적으로 본 part의 연구에서는 *E. tarda gyrA*, B *par C*, E gene 의 총 4개 quinolone 관련 모든 유전자에 관한 최초의 보고로서 그 mutation의 특성과 내성의 진화에 대하여 정밀 분석 하였다.

3. Multiplex PCR을 이용한 어병 세균의 *tet* 유전자 분석

우리나라 양식현장의 병어로부터 분리한 어병 세균 중에 tetracycline에 대한 내성균의 비율을 분석하였으며, 이들 내성균이 갖는 내성 유전자 분석을 위하여 *tet A*, B, C, D, E, 그리고 G에 대해 그 크기가 구별되는 specific primers를 제작한 후 PCR기법으로 어병 세균의 Tc 내성 유전자의 분포와 기원을 간접적으로 추정하고자 하였다. 1993년부터 2003년까지 우리나라 양

식장에서 분리된 대부분의 어병 세균은 *E. tarda*와 *Vibrio* spp.로 나타났으며, tetracycline에 대한 내성균의 비율은 각각 15%, 26%임을 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 내성균들에는 어떤 종류의 *tet* gene이 분포하고 있는지 분석한 결과 *E. tarda*에서 8균주는 *tet A*, 7균주는 *tet D*, 2균주는 *tet B*, 그리고 *tet A · D*, *tet A · G*와 같이 두 종류의 gene을 가진 균주가 각각 2, 1로 나타났으며, *Vibrio* sp. 균주는 모두 *tet B*를 가짐을 확인할 수 있었다. 그리고 나머지 *A. hydrophila*의 두 균주에서는 *tet E · C*, *tet C*, *P. micrabilis*의 두 균주는 모두 *tet C*, 그리고 *Acinetobacter lwoffii*는 *tet B*가 있음을 확인할 수 있었다. 양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. 분리된 내성균에는 *tet B*, *tet C*만을 확인할 수 있어 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중되게 나타났다. 항생제를 투여한 후 조피볼락의 장내 세균에서의 내성 변화를 관찰한 결과 항생제 투여가 끝난 후 1, 4일째까지는 85, 83%로 내성균의 빈도가 증가하다가 그 후로는 감소하는 경향을 보였으며, 실험 마지막 날인 20일에는 항생제를 투여하기 전과 같은 내성균의 빈도를 나타냈다. 검출된 내성균으로부터 whole cell bacteria를 분리하여 어떤 종류의 *tet* gene이 존재하는지 PCR을 실시한 결과 *tet B*, *tet C*를 확인할 수 있었다. 즉 우리나라의 Tc 내성균은 net의 부착물질에 가장 많고 유전자는 *tet B*를 가장 많이 활용하고 있으며 종류에 있어서는 비교적 제한적이라고 할 수 있다.

4. 수입 해산어와 관상어에서의 Tc 내성 유전자

한국의 수생 환경중의 *tet* gene의 분포를 PCR 기법으로 결정해보기 위해서, 한국 근해로부터, 수년에 걸쳐 테트라사이클린에 내성을 나타내는 32종의 *Vibrio* spp.와 16종의 장내 세균을 분리하였다. Efflux gene인 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*,

tet(D), *tet(E)* 그리고 *tet(G)*을 검출하기 위한 multiplex PCR 방법에 의해 분리 균주들을 테스트한 결과, 장내 세균에서는 다양한 종류의 *tet* gene이 검출되었으나, *Vibrio* sp.에서는 여섯 개의 *tet* gene 중 *tet(B)* 만이 나타났다. 또 *tet(K)*, *tet(L)* 및 *tet(M)*에 대한 특이적인 primer를 사용하여 분리 균주들을 시험해본 결과, 장내 세균 중에서 *tet(K)*와 *tet(M)*를 지닌 균이 각각 1균주씩 검출되었고, 놀랍게도 모든 *Vibrio* spp.에서는 ribosomal protection gene인 *tet(M)*이 검출되었다. 따라서 한국에서 발견된 모든 *Vibrio* spp.에서는, *tet(B)*와 함께 *tet(M)*이 테트라사이클린 내성 인자로서 존재한다는 것을 알 수 있었다.

두 가지 주요한 *tet(M)*인 Tn916과 Tn1545의 *tet(M)*의 염기 서열의 conserved region과 variable region으로부터 증폭산물의 크기가 다르도록 제작된 primer들을 이용하여 multiplex PCR을 실시한 결과, 한국의 수생 환경에서 분리된 모든 *Vibrio* sp.는 Tn1545에서 유래된 *tet(M)*을 지니고 있었음이 확인되었다. 반면, 장내세균의 하나인 CJV23의 경우, Tn916으로부터 유래된 *tet(M)*을 지니고 있었으며, *Vibrio* spp.와 CJV23의 *tet(M)*의 염기 서열을 분석하여 보고되어 있는 Tn1545 및 Tn916의 *tet(M)*과 비교하였다. 그러나, Tn1545-like genes들과 link 되어 있다고 알려져 있는 *erm(B)*와 *aphA3*는 Tc-resistant *Vibrio* spp.뿐만 아니라 erythromycin에 resistant 한 9 *Vibrio* spp. strains에서도 발견되지 않았다.

*tet(B)*와 *tet(M)*에서 제작된 primer들을 조합하여, DNA 선상에서 두 유전자의 방향과 거리에 따라 PCR의 증폭 산물이 생성되도록 하여, *tet(B)*와 *tet(M)*의 상대적인 거리에 대해 알아보려고 하였다. 그 결과, *tet(B)*상의 한 primer와 *tet(M)*상의 한 primer에 의해 증폭산물이 생성되었으며, 분석 결과, *tet(M)*은 *tet(B)*의 3' end와는 2,536bp 떨어진 거리에 위치하고 있었으며, *tet(B)*를 포함하고 있는 Tn10의 바로 뒤에 위치하고 있었다. 본 연구는, *Vibrio* spp.에서의 *tet(M)*의 발견에 대한 최초의 보고이다.

그리고 이전 3개월간 항생제를 투여한 적이 없는 우리나라의 양어장으로부터 얻은 조피볼락과 넙치를 시료로 하여 TCBS, CC 선택배지를 이용한 장내 세균의 분포 분석하였다. 장내 세균의 48~68%, 10~33%는 각각

Vibrionaceae, *Enterobacteriaceae* 계열로 확인되었으며 이중 Tc, Am, Cm, OA, St, SF에 대하여 *Vibrionaceae*는 46%, 48%, 33%, 8%, 23%, 53%, *Enterobacteriaceae*는 10%, 22%, 3%, 8%, 15%, 5%의 내성 비율을 보여 주었다 (Table 1). Tc 30 μ g/ml이 첨가된 ST 배지로부터 무작위로 분리한 50개의 내성균이 가지고 있는 *tet* 유전자를 각각 분석한 결과 *tet*(A)와 *tet*(B)가 20%, 60%로써 *tet*(B)가 major type 으로 확인되었다. 이러한 결과는 장내 세균에서 높은 출현 빈도를 보이고 Tc에 대해서도 46%의 내성균 비율을 나타내는 *Vibrionaceae* 계열의 균주에 의하여 큰 영향을 받은 것으로 추정되었다. 그리고 국가간 비교에서 중국의 Tc 내성균 비율은 3~31%로 다양한 내성 비율을 나타내었으며 일본은 33~55%의 내성 비율을 나타내 우리나라나 중국에 비해 다소 높은 경향을 나타내었다. 유사한 분석을 관상어를 대상으로 실시한 결과 Tc의 경우 우리나라에서 양식된 담수 관상어 장내 세균에서 약 39%의 내성 비율이 나타났다. 이는 대만 (7%)을 제외한 싱가포르 48%, 중국 58%, 태국 87%, 인도네시아 88%를 나타낸 수입된 관상어 장내 세균의 내성 비율에 비해 다소 낮은 수치이다. 태국, 인도네시아에서 87%와 88%의 높은 Tc내성 비율이 나타난 반면 중국과 싱가포르에서는 우리나라에 비해 약 10% 정도 높은 내성수치가 나타났다. 그러므로 외국산 (일본 포함)의 어류는 국내산에 비하여 비교적 높은 항생제 내성 위험성이 있다고 추측 된다.

V. 연구개발 결과의 활용계획

- 최근 어병의 증가와 함께 내성균 발생도 증가하고 있으므로 그 증가의 현상에 대한 이해 증진
- 내성 유전자가 어떤 특성을 가지고 있는지 그리고 그 위험성은 어떠한지에 대한 분석이 이루어져 향후의 대처 방안 모색 가능.
- 외국으로 부터의 많은 이식 어류가 과연 이식성 내성 유전자를 가지고 들어오고 있는지에 대한 분석이 이루어 짐.
- 본 연구는 이러한 국내 국제 내성균문제에 대한 중요한 정보를 확립하고 그것을 database화하여 두는 것은 우리나라 수산업 보호를 활용 할 수 있음.
- 그리고 국제 무역 등에서 과학정보에 바탕을 둔 우위의 협상에 활용.
- 즉 선진화된 기본 정보를 제공하며 양식산업 보호와 국제 무역 수지개선에 대단히 중요한 정보제공을 할 수 있는 DATA의 축적.
- 다양한 수입어의 유통과정 중 내성 변화 분석을 제도적으로 추적 하는데 활용 할 수 있음.
- 수산물의 원산지판명 등에도 본 연구의 기법과 개념은 적용할 수 있고 또 직접 응용도 가능 함.
- 외국에서 밝혀진 유전정보를 제외한 새로운 유전정보도 확실하게 얻을 수 있으므로 새로운 내성 유전자 정보를 얻는 본 연구가 이루어지면 이에 바탕을 둔 진전된 향후의 분석이 아주 용이 할 것임
- 내성 유전자의 발현과 조절이라는 기초학문적 분야에서도 활용할 수 있음.
- DNA walking에 의한 새로운 variable region screening법은 다른 분야에서 활용 가능한 과학적인 기법임.
- 다른 세균 또는 사람의 세균에까지도 본 연구의 개념이 응용되고 database화 실시가 가능함.
- 협동조합이나 국립보건원 등이 실시 하고자 하는 관상어에서의 질병 및 내성균 유입 조기 경보체계 확립에 활용할 수 있음.

SUMMARY

< Title >

Characterization of the antibiotics resistant determining genes carried by aquatic bacteria in Korea

A. Characterization of the β -lactamase genes from the isolates of *Vibrio* spp. and *E. tarda* in Korea

PCR was performed to analyze the bla genes carried by ampicillin resistant *Vibrio* spp. strains isolated from marine environments from 1997 to 2003 in Korea. Unfortunately all tested 36 strains showed negative results in PCR with the primers designed from the nucleotide sequences of various known bla genes. It pushed us to screen the new bla gene that may has not been reported. From the *Vibrio alginolyticus* KV-3 isolated from the coastal waters of Keoje island of Korea, novel bla gene was cloned. The determined nucleotide sequence (bla VAK) revealed an ORF of 852 bp encoding a protein of 284 amino acids and did not show high homology to any other bla genes in data bases. The deduced 284-amino acid sequence of VAK-1 would consist of 19 signal peptide and 265 matured protein contained highly conserved peptide segments specific to class A blas including the specific amino acid residues STFK (70nd to 73th), SDN (133th to 135th) E (166th), and RTG (234rd to 236th). SDS-PAGE and IEF with the bla functional assay elicited that the Mw

and pI of the bla VAK-1 were 30 kDa and close to 5.2 as predicted respectively. In performed PCR with the primers specific to bla VAK-1 gene, four strains in 36 strains isolated in our laboratories from marine environments from 1997 to 2003 in Korea, one *Vibrio alginolyticus*, one *Vibrio cholerae* and two *Photobacterium damsella* spp. generated the specific amplicons and indicating the diversity of bla genes of ampicillin resistant strains in marine environment. In mating experiment, one strains carrying mobile plasmid did not transferred VAK-1 bla gene to *E. tarda* PPD recipient. Thus such nonmobile characteristic and presence of chromosomal Acyl Co A sequence flanking at the 5 end of KV-3 bla gene allowed us to assume the location of this new bla gene in chromosome rather than mobile plasmid. Antibiotic susceptibility of bla VAK-1 was indicated by the elevated levels of resistance to penicillins but not to cephalosporins in wild type and *E. coli* DH5 α harboring recombinant plasmid pKV-3 compared to those of the host strain alone. Phylogenetic analysis showed that this bla VAK-1 is a new and separated member of class A.

For the determination of ampicillin resistance in *E. tarda*, one of the most important bacteria in aquatic industry, we isolated 12 high resistant bacteria to ampicillin from 115 isolates obtained from South sea and Jeju area. MIC to β -lactam antibiotics appeared to be very high to the family of penicillin but not to the family of cephalosporins and suggested the absence of ESBL gene in *E. tarda*. widespectrum of β -lactam antibiotics may be useful still to the treatment of Edwardsiellosis disease in Korea. Detected TEM-1 gene in 10 isolates among 12 were transferable and implied very fast spreading of the ampicillin resistance to the environmental microorganisms. All these are utilizing P3 promoter known the weakest one in P3, Pa/Pb, P4, P5 promoters for ampicillin resistance.

B. Molecular Cloning and Characterization of Quinolone Resistance gene in *Edwardsiella tarda*

Knowing the entire sequence of the DNA gyrase subunit A (*gyrA*, B, par C, E) gene of *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) could be very useful for the analysis of quinolone resistance. Degenerate primers for the amplification of *gyrA*, B were designed by using consensus nucleotide sequences of *gyrA*, B from nine different gram negative bacteria including *Escherichia coli* (*E. coli*). With these primers, DNA segments of the predicted size was amplified from the genomic DNA of *E. tarda* and then the flanking sequences were determined by a cassette ligation - mediated polymerase chain reaction (PCR). Determined nucleotide sequence was highly homologous with those of other bacterial species *gyrA*, B in both the whole open reading frame (ORF) and quinolone resistance-determining region (QRDR). The 2637bp *gyrA* gene encodes a protein of 878 amino acids, preceded by putative promoter, ribosome binding site, and inverted repeated sequences for cruciform structures of DNA. Additionally, we also have determined the full sequence of par C, E genes of *E. tarda*. GyrA of *E. tarda* complemented the GyrA mutated to be sensitive at high temperature *E. coli* KNK453 strain at 43°C. In the analyzed nucleotide sequence of the flanking region, we could not find regions showing homologies with those of other bacterial DNA gyrase subunit B (*gyrB*). It suggested that *E. tarda* contains noncontinuous gyrase genes, *gyrA* and *gyrB*, on the chromosome. In 12 quinolone-resistant isolates examined, there was only a single type alteration within the QRDR, Ser-83 to Arg.

We also selected the mutants resistant to quinolones in vitro from quinolone-susceptible *E. tarda* by exposure to the stepwise increasing

concentrations of nalidixic acid and ciprofloxacin. In mutants achieved in vitro selective steps, all resistance mutants examined showed an alteration within the QRDR, Asp-87 to Gly. It suggested clinical isolates and in vitro mutants of *E. tarda* resistant to quinolones is primarily related to alteration in *gyrA*.

Additionally in this study an economical and time-efficient mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR was developed to detect mutations in the *gyrA* gene, and applied to the analysis of mutation occurred in *gyrA* of clinical isolates and in vitro mutants of *E. tarda*. With the cloning of the *gyrA*, full length of genes encoding *gyrB*, *parC* and *parE* were also cloned from *E. tarda* by amplification with primers of the QRDR, followed by cassette ligation-mediated PCR. The *E. tarda* *gyrB*, *parC* and *parE* code for proteins of 100, 200 and 300 amino acids, respectively. The topoisomerase genes, *parC/parE* are contiguous in the chromosome of *E. tarda*. The *gyrB*, *parC* and *parE* were most closely related to *E. coli* (*gyrB*) and *Klebsiella* (*parC*) and *Vibrio* spp. (*parE*). To analyze the role of DNA gyrase and topoisomerase IV in quinolone resistance of *E. tarda*, we analyzed the resistant isolates in Korea and found that point mutations both in the *gyrB* and *parC* QRDRs were detected in strains with high-level resistance. These results suggest that *gyrA* and *parC* are the important targets for quinolone in *E. tarda*.

C. Application of multiplex PCR for the analysis and Characterization of *tet* genes in fish pathogenic bacteria from Korea

Multi-drug resistant isolates carrying tetracycline resistance gene were obtained from various locations in Korea and were analyzed the distribution and origin of the *tet* genes. Frequency of tetracycline

resistance bacteria found in *E. tarda* and *Vibrio* spp. as major fish pathogenic isolates from 1993 to 2002 was 15% and 26%, respectively. Specific primer pairs were designed to determine of *tet* A, B, C; D, E and G commonly found in Gram-negative organism by PCR. With the developed multiplex PCR method, it was found that *Edwardsiella tarda* isolates contained diverse *tet* genes, *tet* A, *tet* D, *tet* B, *tet* A · D and *tet* A · G, in contrast *Vibrio* spp. contained only *tet* B. Additionally, multiplex PCR with the mixture of an one sense primer derived from the conserved region of six different *tet* genes and six antisense primers specific to each different *tet* gene was developed to analyze the *tet* genes in a single tube with one reaction. Multiplex PCR should result in significant savings in terms of labour and cost in analysis of a large number of strains when compared with using an individual PCR for targeting each gene. It may also be a useful method to differentiate the types of tetracycline resistance when used as an additional market for the purpose of outbreak investigation and surveillance. Most of *tet* genes of the analyzed 18 *E. tarda* isolates found in plasmid, while *tet* B gene of two *E. tarda* isolates was localized on chromosome. The frequency of oxytetracycline resistance in the aquatic environmental bacteria were monitored from the farms in field. The frequency of Tc resistant bacteria present in the seawater, sediment and net was 6.7%, 24.4% and 30.7%, respectively. The analyzed Tc resistant frequency in intestinal microflora of rockfish treated OTC before 1 week of sampling was 2.83% compared with the 0.25% in rockfish without antibiotics treatment at least before 3 months of sampling. Rockfish were held in experimental tanks and oxytetracycline-HCl was administered at 125mg/kg body weight per day for 10 day via medicated feed. The changes of oxytetracycline resistance was monitored in samples taken from the intestinal contents of

the fish. The range of the mean frequencies of resistance of the intestinal flora in the period before medication (6~27%) were lower than the frequency of resistance in the microflora after medication (32~85%).

D. Characterization of tetracycline resistance genes in the isolates from marine and ornamental fishes

Understanding of molecular characterization of *tet* genes is important to analyze the appearance of tetracycline resistant bacteria in fish pathogenic bacteria. Total of 16 *Enterobacteria* and 32 *Vibrio* spp. were isolated from the intestinal tract of marine fish and aquatic environments of Korea to determine the dissemination of the *tet* genes using a polymerase chain reaction (PCR) assay. Unlike the *Enterobacterial* isolates appeared to contain various types of *tet* gene, all *Vibrio* spp. were positive for only *tet*(B) in multiplex PCR that can discriminate six different *tet* genes, *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E) and *tet*(G) encoding the efflux proteins. The most unexpected finding in further analysis for *tet*(K), *tet*(L) and *tet*(M) was that all *Vibrio* spp. examined also carried *tet*(M) with *tet*(B). Thus in *Vibrio* spp., found in Korea, both *tet*(B) and *tet*(M) genes are highly disseminated as a determinant of tetracycline resistance. Additionally, by the different sizes of the amplicons, multiplex PCR with the primers derives from the variable and conserved regions of two major prototypes of *tet*(M) gene, *Tn1545* and *Tn916*, allowed us to confirm that all tetracycline resistant isolates of *Vibrio* spp. from the aquatic environments of Korea carried *tet*(M) gene derived from the conjugative transposon *Tn1545*, whereas an enterobacterial strain CJV23 derived from *Tn916*. The full length DNA nucleotide sequence of *tet*(M) in *Vibrio* spp. and CJV23 and compared with that of *tet*(M) present in *Tn1545* and

Tn916. However, *erm*(B) and *aphA3*, known to be linked to Tn1545-like genes, were not detected in Tc-resistant *Vibrio* spp., even in 9 strains resistant to erythromycin.

The relative location of *tet*(B) and *tet*(M) were examined using the PCR method with the different combination of primer sets derived from *tet*(B) and *tet*(M) to produce amplicons depend upon the orientation and distance of these two genes on DNA. The amplicon was generated using the one primer designed from the nucleotide sequences of *tet*(B) gene and other from *tet*(M) genes. It came out that *tet*(M) gene was located 2,536bp apart from the 3' end of *tet*(B) gene or just 3'end of IS10 sequence of Tn10 contained *tet*(B) gene.

The *tet* genes were analyzed in the normal microflora in the bacteria of intestinal tract of the fish that have never exposed to Tc at least for 3 months before this analysis. Dominant microorganisms were *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* showing (46%, 48%, 33%, 8%, 23%, 53%) and (10%, 22%, 3%, 8%, 15%, 5%) resistant to Tc, Am, Cm, OA, St, SF respectively. Determined *tet* genes of 20%, 60% proportions in the intestinal tract organisms were appeared to be *tet*(A) and *tet*(B) respectively. However, Ent-lac⁺ were utilizing *tet*(A) as a dominant *tet* gene and different from that of *Vibrionaceae*. In terms of the level of Tc resistant bacteria, imported fish from Japan were carrying the highest level of resistant bacteria compared to that of Korea or China.

Enterobacterial Tc resistant bacteria from the intestinal tract of the imported ornamental fish were also isolated using CC agar plate contained Tc. Microflora obtained from the imported fish showed higher level of resistant bacteria compared to that of the flora from domestic fish, especially imported fish from Taiwan, Indonesia and Brazil were carrying the flora of the highest level of resistant bacteria. Specifically,

proportion of the Tc resistant bacteria were 39%, 7%, 48%, 58%, 87% and 88% in the flora of the fish cultured in Korea, Taipei, Singapore, China and Indonesia respectively.

CONTENTS

Chapter 1. Objects of the Research	20
Chapter 2. Current Status and Domestic and International Informations	22
Chapter 3. Research Contents and Results	24
Section 1. Characterization of the β -lactamase genes in <i>Vibrio</i> spp. from Korea	24
Section 2. Characterization of the β -lactamase genes in <i>E. tarda</i> from Korea	48
Section 3. Molecular Cloning and Characterization of Quinolone Resistance gene in <i>Edwardsiella tarda</i>	58
Section 4. Application of multiplex PCR for the analysis and Characterization of <i>tet</i> genes in fish pathogenic bacteria from Korea	87
Section 5. Characterization of tetracycline resistance genes in <i>Vibrio</i> spp.	104
Section 6. Characterization of tetracycline resistance genes in normal microflora from domestic and imported fish species	129
Chapter 4. Achievement to the Research Purpose and Contributions to the Related Areas	138
Chapter 5. Application Plans of Research Results	139
Chapter 6. Cited References	140
Attachment	
Self-Evaluation	150

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	20
제 2 장	국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보	22
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절	<i>Vibrio</i> spp.에서의 β -lactamase 유전자 조사	24
제 2 절	<i>Edwardsiella tarda</i> 에서의 β -lactamase 유전자 조사	48
제 3 절	<i>E. tarda</i> 의 quinolone 계 항생제에 대한 내성과 관련 유전자의 cloning과 특성 분석	58
제 4 절	Tetracycline 내성 유전자 분석을 위한 multiplex PCR의 응용과 양식현장 Tc 내성균의 유전적 특성 분석	87
제 5 절	<i>Vibrio</i> spp.에서의 <i>tet</i> 유전자 분석을 통한 Tc 내성 유전자의 발현 특성	104
제 6 절	수입산 어류의 장내 세균에서의 항생제 내성균 비율과 <i>tet</i> 유전자 분석	129
제 4 장	연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	138
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	139
제 6 장	참고문헌	140
별 첨		
자체평가의견서		150

본 문

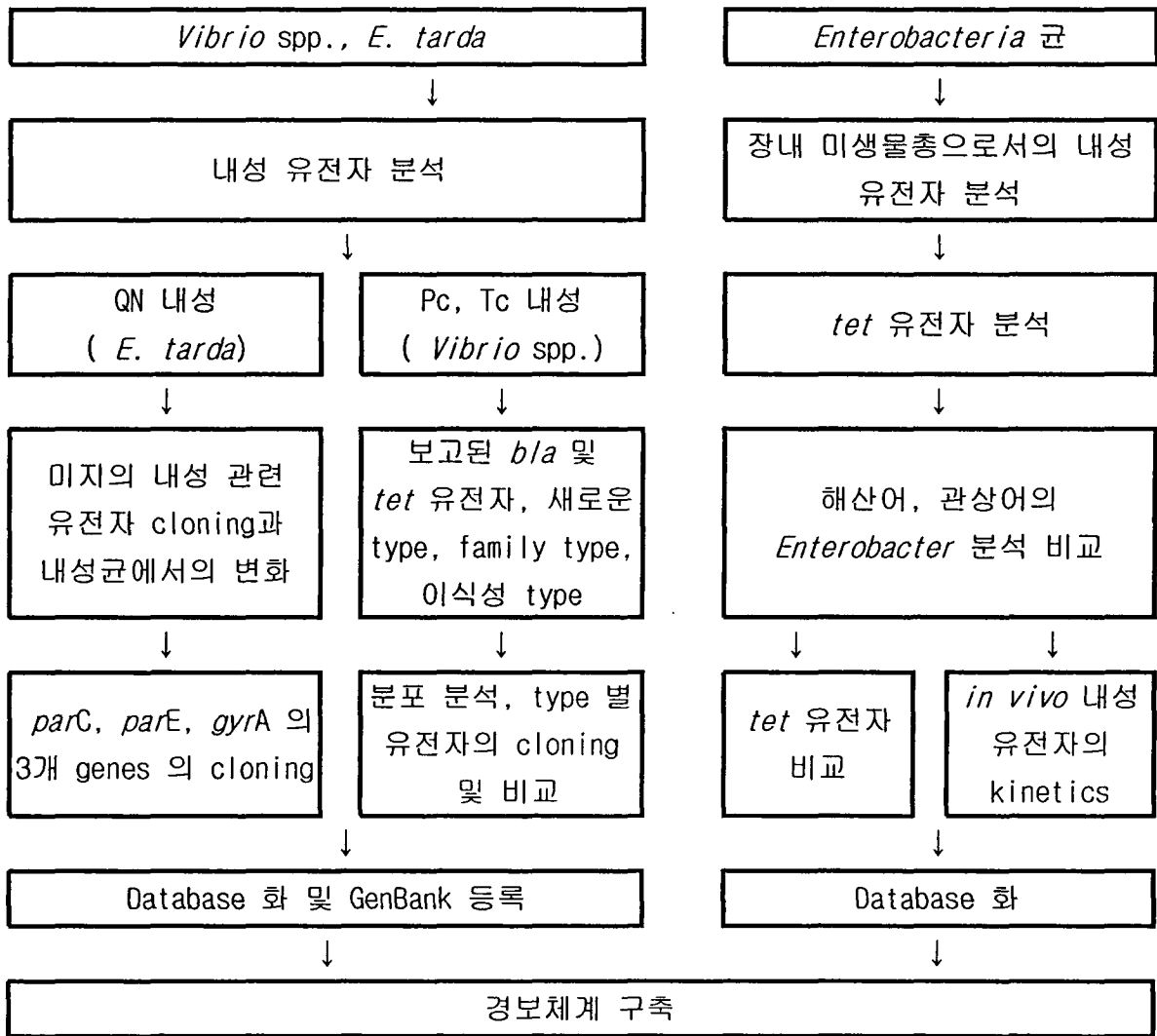
<우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석>

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 본 연구에서는 우리나라에서 대표적으로 많이 사용되고 있는 항생제, 즉 tetracycline 계, quinolone계 그리고 beta lactam 계 항생제 각각에 대하여 우리나라에서 나타나는 양식현장의 세균에서는 과연 새로운 type의 내성 유전자가 발견 나타나고 있는지, 그리고 기존의 유전자 type에서는 어떠한 종류가 발견 되고 있는지를 밝히고, 그것을 외국에서 수입되고 있는 활어에서 나타나는 내성 결정 유전자와 어떠한 분포의 차이를 보이는지를 분석하고자 한다.

- 양식 현장에서 가장 빈번하게 사용되고 있는 항균물질에 (이후는 항생제로 함) 대하여 해양 환경 중의 세균이 나타내는 내성에 대한 연구는 세계적으로 뿐만 아니라 우리나라에서도 활발하게 그리고 다양한 연구가 이루어져가고 있다. 그러나 그 내성 유전자의 근원과 변이 그리고 특히 새로운 내성 유전자에 대한 보고는 연구의 결과획득에 대한 위험도 때문에 매우 제한적으로 발표되고 있는 실정이다. 그러나 선진 외국에 비하여 비교적 항생제를 자유롭게 사용하고 있는 우리나라의 양식 현장의 세균에서는 새로운 항생제 내성 결정 인자가 나타날 수 있는 잠재력이 크다. 그러므로 항생제 내성 결정 인자 (내성 target 분자의 변화를 포함)의 변화 또는 새로운 내성 인자의 출현에 대한 분석은 수산업계와 인간 건강에 대한 공통 위험 요인으로서 지속적으로 monitoring이 이루어져야 할 것이다.

- 이를 위한 연구의 범위를 보면 다음과 같다.



- 결론적으로 본 연구는 가장 중요한 어류 질병 세균인 *E. tarda*, 그리고 가장 중요한 해양 환경 세균인 *Vibrio* spp.에서 가장 중요한 3대 항생제 대하여 나타나는 내성 유전자의 분석을 기초과학적인 접근 (미생물학, 분자 생물학, 새로운 유전자 탐색과 기능 분석)과 응용과학적인 접근 (분포, 확산, 지역간의 비교, 유전적 변이, 그리고 ESBL 확인) 양쪽 모두의 관점에서 실시 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보

- 현재 미국 FDA에서 수산생물의 질병 치료를 위해 공식적으로 허가한 항생제에는 Terramycin (oxytetracycline; Pfizer)과 Romet-30(5:1, sulfadimethoxin: ormethoprim; Hoffmann -La Roche) 두 종류뿐이다. 그러나 우리나라에서는 양식 현장에서 Tetracycline, Quinolone, 그리고 Penicillin계 약물의 사용으로 내성을 가지는 많은 종류의 어류질병 관련 내성균이 발생하고 있지만 이들 내성균이 나타내는 내성 유전자의 특성에 대하여서는 아직도 그러한 내성 결정기의 유래는 어디라고 추정 되어지는지 등에 대한 분석은 전혀 되어 있지 않다. 이러한 제반 문제의 현주소와 필요한 대책을 개요적으로 보면 다음과 같다.

내용	현황	문제점	대책
내성균 연구	*현황에 대한 포괄적 연구는 있음	*유전적 뒷받침 및 해석은 이루어지지 않고 있음	*지속적인 분석과 database화 추진 *screening 작업 또는 새로운 type에 대한 조사 필요
QU 내성 연구	*사람이나 동물에서 나타나는 다양한 세균의 관련 유전자 분석이 이루어져 있어 내성 변화 단계 추정 가능	* <i>E. tarda</i> 등 직접적인 어병 원인세균에서의 관련 유전자 분석은 없음	*기초적인 cloning부터 실시되어야 함. * <i>in vitro</i> mutant의 활용 필요
Pc 내성 유전자	*특정 해양 환경 세균 들은 특정 <i>bla</i> 유전자를 활용 * <i>Vibrio</i> spp.에서는 <i>V. cholerae</i> 에 대한 것이 대다수임	* <i>E. tarda</i> 등에서의 <i>bla</i> 활용에 대한 보고 없음 *해양 major 세균인 <i>Vibrio</i> spp. 에서의 Pc 내성 유전자 분석은 매우 제한적 임	*해양 환경 세균에서의 dominant <i>bla</i> 유전자 분석 *새로운 type의 내성 유전자 screening 필요
<i>tet</i> gene 특성	*최대 사용 항생제로서 다양한 세균에서 다양한 type 들이 발현될 것으로 추정 됨	* <i>tet</i> gene type의 monitoring 사례 없음 *새로운 type의 출현 보고 없음	*우리나라 어류 장내세균 의 <i>tet</i> gene 분석 필요 *특히 <i>Vibrio</i> spp.에서의 <i>tet</i> gene 분석이 필요 *해양 인접국과의 비교
이식성 내성 결정 유전자	*수입 활어 및 관상어의 내성균이 갖는 유전자 분석 없음	*내성균의 source 또는 이입 위험성에 대한 분석이 이루어지지 않고 있음	*이식성 내성 유전자의 분석이 필요 * <i>tet</i> gene type 확인 필요 *옛날 분리 균에서의 유전자 존재 확인

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 *Vibrio* spp.에서의 β -lactamase 유전자 조사

1. 총 론

- 비브리오 과에 속하는 어병 세균이 갖는 β -lactamase 유전자는 *Vibrio harveyi*에서 확인된 VHH-1, VHW-1 gene만이 보고되어 있다 (Teo et al., 2000). 그러므로 아직 PCR방법으로 TEM, SHV gene을 확인하려는 방법은 시도되었으나 gene의 존재를 확인하지 못하였다 (Zanetti et al., 2000). 본 연구에서는 한국의 여러 지역과 중국, 일본에서 수입한 어류에서 분리한 *Vibrio* spp. 에 있어서 blaTEM, blaSHV gene이 나타나지 않는지 조사하고자 하였다. 그리고 분리된 *Vibrio* spp.가 어떤 특수한 β -lactamase를 갖는지를 확인하기 위해서 *Vibrio* spp. 의 β -lactamase gene을 제한 효소 처리하여 cloning 하였다

2. 방 법

가. β -lactamase 의 유전자 확인을 위한 Primer 제작

- TEM, SHV gene에 특이적인 primer는 여러 논문에 인용 되어 있는 것을 사용하였다 (이, 2003). OXA gene은 Bert et al. (2002)이 사용한 것을 인용하였다. *Vibrio cholerae*에서 알려진 β -lactamase 인 PSE type과 CARB type의 nucleic acid sequence를 Genbank (NCBI) 에서 얻고 (access No. AJ784256, AY008290, Z22590, J03427, AF409092, AF030945, AY248038), Bioedit (Version 5.0.9., Department of Microbiology North Carolina State

University) 를 이용하여 비교한 후 conserve 한 부위에서 primer를 제작하였다. 또한 *Vibrio* spp. 에서 알려져 있는 β -lactamase인 VHH-1, VHW-1, *Vibrio parahaemolyticus* β -lactamase도 Genebank (NCBI)에서 nucleic acid sequence를 얻은 후 각각의 gene을 확인 할 수 있는 특이적인 primer를 제작하였다 (access No. AF217648, AF217649, NC004605). 사용된 primers의 염기 서열과 예상되는 증폭 산물의 크기를 다음의 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various β -lactamase genes

Primer	β -lactamase	Oligonucleic sequence (5'-3')	Expected sizes(bp)
TEM O	TEM	ATAAAATTCTTGAAGACGA	1080
TEM G2		CTGACAGTTACCAATGCTTA	
SHV F	SHV	GGTTATGCGTTATATTCGCC	866
SHV R		TTCAGCGTTGCCAGTGCTCG	
OXA F	OXA	TCAACAAATCGCCAGAGAAG	276
OXA R		TCCCACACCAGAAAACCAG	
PSE F	PSE, CARB	GATTACAATGGCAATCAGCG	550
PSE R		GCTGTAATACTCCGAGCAC	
VHH F	VHH, VHW	TCACCTGAGTGTGAACCGA	981
VHH R		GGATAGTCCTGCTTACTGG	
RIMD F	※	CCTGTTGGTTGGGCTGATG	810
RIMD R		CAGTTGGCTGATTTGCGCG	

※: *Vibrio parahaemolyticus* RIMD β -lactamase

나. PCR

- 일반적인 방법을 따라서 실시하였다 (Jun et al., 2004).

다. Unknown β lactamase 유전자의 cloning

1) 제한 효소의 처리

- 1 μ g의 DNA를 10x restriction enzyme buffer 2 μ l와 잘 섞어준 뒤 여기에 3차 증류수를 가하여 최종 부피가 20 μ l가 되게 하였다. 여기에 1unit 이상의 Sal I (Takara)을 가하고 잘 섞어준 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응 시켰다. 동량의 Phenol/Chloroform을 1회 처리함으로써 반응을 정지시키고 후에 2배 volume의 99% ethanol을 넣고 inverting하여 혼합한 후, -70 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 침전하였다. 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거하고, 70% ethanol로 다시 12000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하는 washing 과정을 거친다. 상등액을 완전히 제거한 후, 10분간 자연 건조시켜, 10 μ l의 distilled water에 재현탁시켰다 (Jun et al., 2004).

2) DNA fragment의 ligation

- Sal I으로 처리한 KV3 DNA fragment를 pHSG398 vector (Takara, CMr)에 삽입하기 위하여 Sal I 처리한 KV3 DNA fragment, 10x ligation buffer 2 μ l, Sal I 처리한 pHSG398 vector, 1 μ l의 T4 DNA ligase (Promega)를 넣고 distilled water를 가하여 최종 부피가 20 μ l가 되게 한 후 잘 섞어주고 12 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 반응 시켰다.

3) Transformation

- Ligation mixture 20 μ l를 calcium chloride법을 사용하여 제작한 *E. coli* DH5a competent cell 100 μ l에 넣고 가볍게 섞어준 후에 ice에 30분간 방치한다. 그 다음 42 $^{\circ}$ C water bath에 1분간 처리해주고 ice에 다시 3분간 방치한다. 그리고 SOC broth 600 μ l를 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분 진탕 배양시킨 다음 ampicillin (30 μ g/ml)와 chloramphenicol (30 μ g/ml)이 들어 있는 LB agar 배지에 200 μ l 도말하였다. 18시간 배양하여 transformant를 선별하였다.

라. Conjugation

- *E. coli* DH5a를 recipient 균주로 사용하였으며, 채집 균주들을 donor 균주로 사용하였다. 또한 이 실험의 결과를 확인하기 위해 *E. coli* 선택 배지인 chromocult agar (Merck)에 항생제를 첨가하여 확인 하였다 (유, 2000; Jun et al., 2004). 본 실험에서는 시험 균주들을 Tryptic Soy Broth (TSB)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 그 배양액을 새로운 TSB에 50 μ l 접종하고 4시간 동안 진탕 배양 시켰다. 전달균주 배양액과 피전달균주 배양액을 1:10의 비율로 새로운 TSB에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 정지 배양 시켰다. 이 배양액을 멸균된 면봉을 이용하여 ampicillin이 30 μ g/ml 농도로 들어가 있는 chromocult agar에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양하여 특이적인 균집락 생성 유무를 조사하였다 (Pai et al., 1999; 이, 2003).

마. 이중디스크 확산법 (Double disk synergy test)

- 시험 균주를 TSB에 접종하여 27 $^{\circ}$ C에서 18시간 배양한 후 10⁷cells/ml로 현탁해서 미리 멸균된 면봉을 이용하여 Muller-Hinton Agar (MH, Difco) 에 고르게 도말하였다. 이 평판의 중앙에 amoxycillin/clavulanate (20/10 μ g, Oxoid) disk를 놓고 디스크의 가장자리 사이의 간격이 10mm가 되도록

cefotaxime (30 μg , Oxoid), ceftazidime (30 μg , Oxoid), ceftriaxone (30 μg , Oxoid) disk를 놓고 다시 똑 같은 과정으로 20mm가 되도록 각각의 disk를 놓았다. 27°C에서 18시간 배양한 후에 두 disk 사이에서 나타나는 억제대의 양상을 가지고 상승효과를 판정하였다 (이, 2003).

바. KV3 β -lactamase gene의 Isoelectric focusing (IEF)와 SDS-PAGE

- 시험 균주를 20ml의 TSB에 접종하여 각각의 적온에서 18시간 진탕 배양하였다. 이를 12,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 균체를 얻고 다시 PBS (Phosphate Buffered Saline) 에 3회 세척한 후, 다시 12,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하여 그 침사를 3차 증류수 750 μl 에 재부유하였다. 재부유물이 담긴 시험관을 얼음에 꽂은 채 초음파 파쇄기 (Ultrasonic homogenizer 4710, Cole-Palmer Instrument)를 이용하여 1분간 2회 분쇄 하였다. 이를 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리 하여 상정액을 시험관에 옮긴 후 시험 전까지 70°C에 보관하였다 (이, 2003). 분자량을 알기 위해서 Bollag and Edelstein 의 방법을 인용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. IEF는 native isoelectric focusing gel 을 제조하여 실시하였다. H₂O 4.85 ml, solution A 1 ml, pH 3.5-10 ampholyte solution(Bio-Rad) 24 μl , pH 4-6 ampholyte solution(Bio-Rad) 120 μl , 10% ammonium persulfate 25 μl , TEMED(Sigma) 10 μl 를 잘 혼합하여 제조하였으며 solution A는 acrylamide 24.5g 과 bis 0.75 g을 혼합하여 증류수 100ml에 녹인 후 0.45 μm filter를 이용하여 여과시킨 후 갈색병에 넣어 4 °C에서 보관하여 사용하였다. 제조한 gel을 casting tray에 넣고 형광등 아래에서 2시간 동안 중합 시킨다. IEF는 Mini IEF cell system (Bio-Rad)을 이용하여 실시하였다. 먼저 lower chamber에 lower buffer (H₃PO₄ 1.36ml, H₂O 2 l)를 적당량 채우고 gel을 고정한 upper chamber를 넣어준다. 후에 upper buffer (100mM NaOH)를 적당량 채워준다. sample template 20 μl 를 넣고 isoelectric focusing chamber의 흑연전극을 습윤한 상태로 유지시키고 유리판의 gel 부분이 흑연전극에 닿도록 하여

200 V에서 3시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 glass plate로부터 gel을 분리하여 nitrocefin (Oxoid) 용액에 적신 여과지 (Whatman No. 54 paper)를 gel 위에 덮어서 특이적으로 나타나는 band를 확인 하였다. pI 판독을 위해서 IEF 표준 marker (Bio-Rad)를 사용하였다.

사. KV3 β -lactamase gene의 *Vibrio* spp. 에서의 분포

- KV3 β -lactamase 만을 detection하기 위하여 *Vibrio* spp. 에서 확인된 여러 β -lactamase와 KV3 β -lactamase nucleic sequence를 sequence 비교 program인 Bioedit (Version 5.0.9., Department of Microbiology North Carolina State University)를 이용하여 비교한 후 KV3 β -lactamase 의 특징적인 부분을 선택하여 primer를 제작하였다 (Table 2).

Table 2. Primers and expected sizes of PCR amplicons for KV-1 gene

Primer	β -lactamase	Oligonucleic sequence (5'-3')	Expected sizes(bp)
KV F	VAK-1	GTCGTCACACACGGTTGCAG	567
KV R	β -lactamase	CAAGTCAGCAGAGTCTG	

3. 결 과

가. *Vibrio* spp.

1) *Vibrio* spp.에서의 β -lactam 계열 항생제 내성

- 동해안, 남해안의 여러 양식 어장의 어류와 해수에서 120개의 *Vibrio* spp. 를 분리 한 후 무작위적으로 61개를 선정해 다양한 β -lactam 계열 항생제에 대한 MIC를 agar plate method를 사용하여 측정 하였다. 본 실험 결과 80% 이상의 *Vibrio* spp.에서 ampicillin에 대해 내성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다 (Table 3). 이전에 보고된 *Vibrio* spp.에 있어서의 ampicillin 내성 비율은 30-98%라고 알려져 있어 그 결과의 유사성을 확인할 수 있었다 (Ottaviani, et al. 2001). 본 연구에서도 ampicillin에 높은 내성 비를 나타냈다. 3세대 cephalosporins인 cefotaxime과 ceftriaxone에 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 보이는 6 균주가 있었는데 특히 그 중 1균주는 clavulanic acid에 억제되면서 cephalosporins에 내성을 나타내어 ESBL이 의심되었다. 하지만 이중 디스크 확산법 (Double disk synergy test)에서 특이적인 synerism이 나타나지 않았다 (data not shown). 따라서 *Vibrio* spp. 에서의 ESBL은 확인하지 못하였다.

Table 3. MIC of *Vibrio* spp. to β -lactam antibiotics

농도 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	β -lactams									
	AMP	AMC	CPL	CFR	CFM	CFD	FOX	CAZ	CFX	CFA
0.03									11	1
0.06									2	24
0.12									4	9
0.25								1	9	4
0.5								6	12	6
1			3	5	13	3	1	5	2	4
2				6	4	1	1	3	8	5
4		15		1	9	10	5	3	5	0
8	5	7	5	8	18	7	4	5	8	2
16		9	4	2	2	1	5	37		6
32	2	4	6	11	1	7	4			
64	3	6	6	15	3	11	25			
128	8	5	18	2	11	6	11			
256	8	1	19	11		15	5			
512	10	3								
1024	12	11								
2048	13									

2) *Vibrio* spp.에서의 β -lactamase detection

β -lactamase의 존재를 확인 할 수 있는 nitrocefin test에 있어서 *Vibrio* 균주의 40% 정도가 positive 반응을 나타내었다 (data not shown). 하지만 이들 균주들에서 그람 음성 균에 존재하거나 NCVs (Non Cholera Vibrios)에 존재한다고 알려진 β -lactamase의 존재를 확인하기 위해서 다양한 β -lactamase gene에 각각에 특이적인 primer를 제작하여 PCR을 해 본 결과 특이적인 PCR 산물을 얻지 못하였다. 따라서 *Vibrio* spp. 에서는 지금까지 알려지지 않은 β -lactamase가 존재할 가능성이 매우 크므로 어떤 β -lactamase gene을 가지고 있는지 알아보기 위하여 *Vibrio* spp.의 β -lactamase를 제한 효소를 처리하여 cloning 하였다. 그 결과 *Vibrio alginolyticus* KV3 균주에서 지금까지 보고된 적이 없는 β -lactamase를 cloning 했다. 이 β -lactamase gene은 class A β -lactamase의 특징인 여러 motif를 가지고 있다. 이들 motif에는 먼저 amino acid 서열 62번째에서 66번에 위치한 Ser - X - X - Lys 가 있는데 이것은 PBP(Penicillin Binding Protein) 와 serine β -lactamase 의 중요한 특징으로 알려져 있다 (Jois, et al. 1991). 다음으로 122-124번에 위치한 SDN loop와 158번에 위치한 Glu 또한 class A β -lactamase의 중요한 특징이다 (Joris, et al. 1991). Promoter 부위의 10, -35 promoter는 각각 TATAAT, CTCAGA로 나왔다 (Fig. 1). 이번에 밝혀낸 β -lactamase는 지금까지 알려진 *Vibrio* spp.의 β -lactamase와는 amino acid sequence 상으로 상당히 다른 형태를 나타냄을 알 수 있었고 NCVs 의 β -lactamase와 밀접한 관계임을 알 수 있었다 (Table 4, Fig. 2, 3).

acyl-CoA thioesterase II ⇒

1 GTC GAC CGA TTT TTT ATC TCA CCG CTT CTT ACC ATG GTG AGG CCC 45
46 CAG GTT TTG AGC ATC AAA ACG CCA TGC CAG ACA TTC CAG GCC CTG 90
91 AGA ATT ACG CTT CTG AAT CAG AGC TTG CTG AAC AGA TAG CAG ACT 135
136 TTT TAC CAG AGG AAA TCA AAG TGG CAT TTT GTG GTG AGA AAC CCA 180
181 TTG AAA CTC GCC CTG TAA CAG TGG TAA ACC CAC TAA AAC CCC ACA 225
226 AAG AAG AAG CAA AGC AAT ATC TGT GGA TTA AGG CCA ACG GAG CCA 270
271 TGC CGG ACA ACC AAC TCA TTC ATC AAT ATC TTC TCG GCT ACG CTT 315
316 CAG ACT GGG GTT TTC TGG TCA CCG CAT TGC ATC CAC ATG GCG TAT 360
361 CAC TGA TGA CGC CTA ATT TCC AAG TCG CCA CCA TCG ACC ATT CAA 405
406 TAT GGT TCC ATC GAC CTT TTA AGA TGG ATG AGT GGT TGC TCT ACG 450
451 TGA TTG AAA GCC CGA CGG CCA GTA ACA CGC GTG GCT TAG TAC GTG 495
496 GTG AGA TCT ATA ACC GTC AGG GTC ATC TGG TGG CTT CTG CCG TTC 540

acyl-CoA thioesterase II stop codon

541 AGG AAG GTG TGA TGC GGT TTA CCA AAT AAC CGT TCC CAA AAA AGA 585
586 GAC CGA ATG TCA GAA TTA TGT ATA CTC TAA ACC CAT CGG GTT TAC 630

-35 -10

631 TCA GGA CAT GAC CTC AGA TTA GGA TGC AAA GCC ACG TAT AAT ATT 675

KV3 β -lactamase gene ⇒

676 TGG CTT ATC TTA ATGAAA AAT ATA CTT ATA ACT CTG ACC TGT CTC 720

1 M K N I L I T L T C L 11

Fig. 1. Nucleotide sequence of the β-lactamase and related genes from *V. alginolyticus*. Possible promoter sequences (-35, -10) can be found upstream of the start codon. Arrows indicate the direction of DNA sequencing. The β-lactamase active site (STFK), typical class A motif (SDN, E), and conserved triad (RTG) are boxed. Ωmark is terminal hairpin following the stop codon. The primers used to detect the gene are underlined.

KV Foward primer»

721 TTT TTCG TCA CAC ACG GTT GCA GAC ACA CTC ACA CAA CAA GTC 765
 12 F L S S H T V A D T L T Q Q V 26
 766 GCT CAG TTA GAG AGT CAA TCT GGT GGT CGT CTC GGT GTC GCC GTT 810
 27 A Q L E S Q S G G R L G V A V 41
 811 TTG GAT ACC CAA AAT AAT CAT CAG TGG CAA TAT CGT GGC GAT GAG 855
 42 L D T Q N N H Q W Q Y R G D E 56
 856 CGC TTC CCT ATG ATG AGT ACC TTT AAA GCA CTG ATG TGT GCC AGC 900
 57 R F P M M S T F K A L M C A S 71
 901 GCA CTC GAC CTT GCT GAC CAA AAC AAG CTT AGC TTA AAC GAC ACG 945
 72 A L D L A D Q N K L S L N D T 86
 946 ACC ACG ATT AAA GAA AGC GAT CTG GTG ACT TGG TCT CCG GTT ACT 990
 87 T T I K E S D L V T W S P V T 101
 991 GAA AAA TTG ATT GGT CAA GAC ATG ACA ATT CAA CAA GCT TGC GAA 1035
 102 E K L I G Q D M T I Q Q A C E 116
 1036 GCG ACG ATG CTG ATG AGC GAT AAC ACG GCG GCC AAT ATC GTA TTG 1080
 117 A T M L M S D N T A A N I V L 131
 1081 CAT CAA ATT GGC GGC CCG CAG CAA GTG ACA CAA TTT GTC CGA ACT 1125
 132 H Q I G G P Q Q V T Q F V R T 146
 1126 CTC GAT GAT AAA GTC ACT CGC CTT GAC CGC TAT GAA CCG GAA CTG 1170
 147 L D D K V T R L D R Y E P E L 161
 1171 AAT CAA GCC ACT CCA GGT GAT AAA CGC GAT ACC ACC TCT CCT CAT 1215
 162 N Q A T P G D K R D T T S P H 176
 1216 GCG ATG GTC ACG TCT CTC AAC ACC ATT TTG CTT CAA GAC GGG TTG 1260
 177 A M V T S L N T I L L Q D G L 191

« KV Revers primer

1261 AGC GAA AAA AAC CAA CAG ACT CTG CTG ACT TGG ATG AAA AAC AAT 1305
 192 S E K N Q Q T L L T W M K N N 206

Fig. 1. continued.

Table 4. Amino acid identity of KV3 β -lactamase with several related class A β - lactamase

	<i>V. fischeri</i>	VHW	VHH	RIMD	AER-1	CARB-2	CARB-5	PSE-1	TEM-1	SHV-1	CTX-M-1
VHW	51										
VHH	53	90									
RIMD	54	79	80								
AER-1	37	39	40	40							
CARB-2	52	46	47	48	41						
CARB-5	43	42	42	44	43	45					
PSE-1	49	44	44	45	42	95	43				
TEM-1	39	34	36	39	40	39	44	37			
SHV-1	37	37	38	40	40	42	43	40	40		
CTX-M-1	30	29	30	30	33	32	35	31	33	34	
VAK-1	52	50	53	52	38	46	43	43	38	40	36

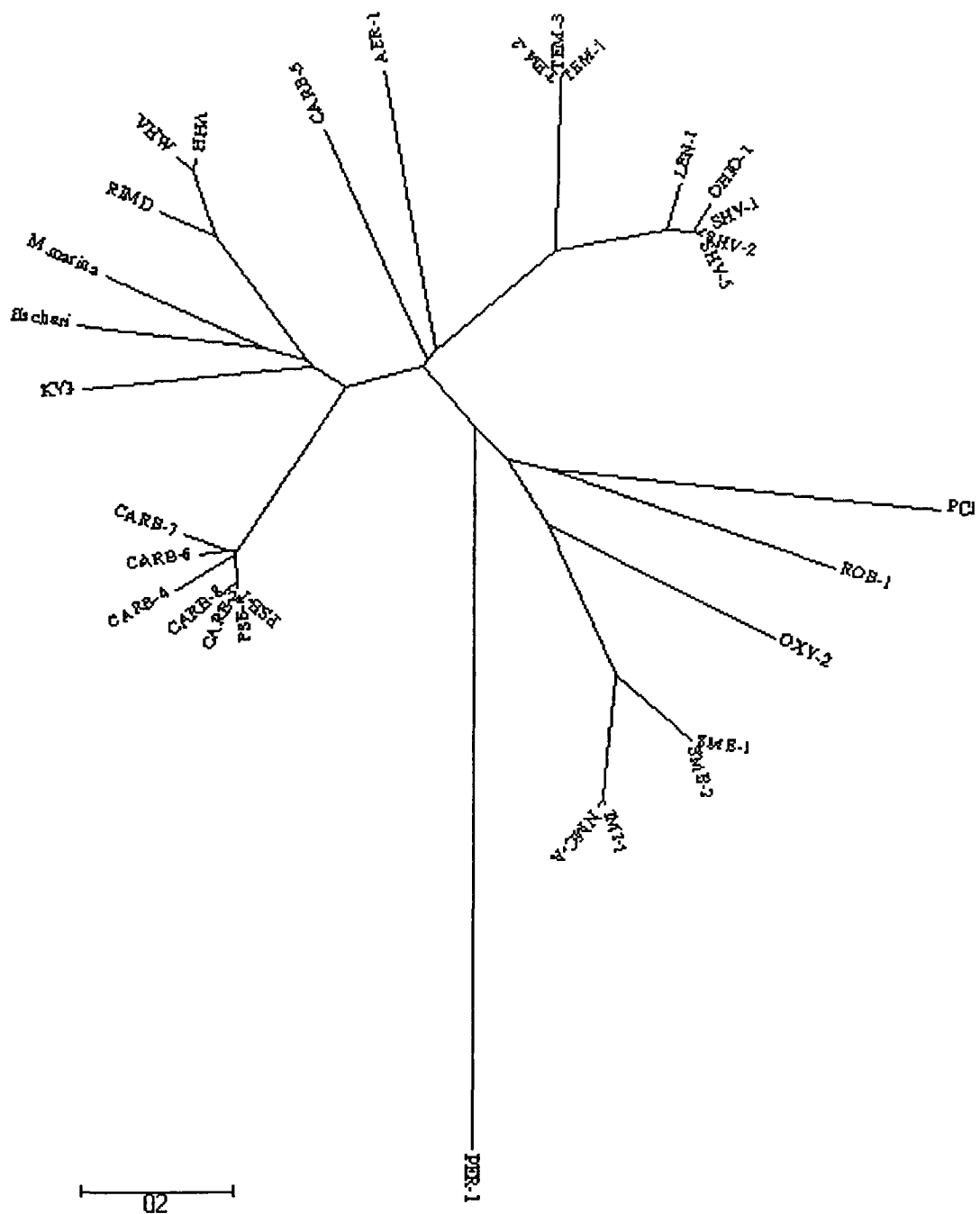


Fig. 2. Evolutionary representation of unrooted phylogenetic tree.

			10	20	30	40	50	60																																				
<i>KV3</i>	1	MKNI	LITL	CLFL	SSHTV	ADT	L	TQQYAQL	ESQS	GRLG	VA	L	DTQ	NNH	WQ	YR	GDER	FPM	60																									
<i>V.fischeri</i>	1	MKIK	PF	LFGL	IY	LANNAT	AGS	LTQ	NEIA	ELSS	GGY	IGV	SL	LN	TET	NK	TW	YK	GD	QR	FPM	60																						
<i>VHV</i>	1	MK	KFL	LGL	LAC	SSATYA	AKL	LN	EDISA	IEHIS	SGRI	GV	SV	W	DTQT	DE	HW	YR	GDER	FPM	60																							
<i>VHH</i>	1	MK	KFL	LGL	LAC	SSATYA	AAN	LM	KTS	PR	LKKHIS	SGRI	GV	SV	W	DTQT	DE	HW	YR	GDER	FPM	60																						
<i>V.parahaemolyticus</i>	1	MK	KFL	LGL	MV	CV	STV	SY	ASK	L	NE	DIS	L	E	K	Q	T	S	G	R	I	G	V	S	V	W	D	T	Q	T	D	K	R	W	Y	R	G	D	E	R	F	P	M	60

			70	80	90	100	110	120																																																					
<i>KV3</i>	61	M	S	T	F	K	A	L	C	A	S	A	L	D	L	A	D	Q	N	K	L	S	L	N	D	T	T	T	I	K	E	S	D	L	V	T	V	S	P	V	T	E	K	L	I	G	D	M	T	I	Q	Q	A	C	E	A	T	M	L	120	
<i>V.fischeri</i>	61	M	S	T	F	K	T	L	A	C	A	K	M	L	Y	D	S	S	Y	G	G	I	D	K	Y	K	T	S	I	T	K	E	Q	I	P	W	S	P	V	T	E	P	L	Y	D	H	M	I	T	T	K	K	A	C	E	A	T	M	L	120	
<i>VHV</i>	61	M	S	T	F	K	T	L	A	C	A	T	M	L	S	D	M	N	E	K	L	D	K	N	A	T	A	K	Y	E	R	N	M	V	Y	W	S	P	V	M	D	R	M	A	G	T	T	R	F	E	H	A	C	E	A	A	M	L	120		
<i>VHH</i>	61	M	S	T	F	K	T	L	A	C	A	T	M	L	S	D	M	N	E	K	L	D	K	N	A	T	A	K	Y	E	R	N	M	V	Y	W	S	P	V	M	D	R	M	A	G	T	T	R	I	E	H	A	C	E	A	A	M	L	120		
<i>V.parahaemolyticus</i>	61	M	S	T	F	K	T	L	A	C	A	T	M	L	S	D	M	S	G	K	L	N	K	N	A	T	A	K	I	D	E	R	N	I	V	Y	W	S	P	V	M	D	K	L	A	G	D	S	T	R	I	E	H	A	C	E	A	A	M	L	120

			130	140	150	160	170	180																																																						
<i>KV3</i>	121	M	S	D	N	T	A	A	N	I	V	L	H	Q	I	G	G	P	Q	-	Q	V	T	Q	F	V	R	T	L	O	D	K	V	T	R	L	D	R	Y	E	P	E	L	N	Q	A	T	P	G	D	K	R	O	T	T	S	P	H	A	M	V	179
<i>V.fischeri</i>	121	M	S	D	N	T	A	A	N	I	V	L	N	E	I	G	G	R	S	-	S	L	T	Q	F	L	R	A	T	G	O	D	K	T	R	L	D	R	I	E	P	E	L	N	E	A	K	N	G	D	K	R	O	T	T	T	P	V	A	M	S	179
<i>VHV</i>	121	M	S	D	N	S	A	A	N	I	V	L	R	S	I	M	G	V	H	A	G	G	T	S	F	L	R	S	I	G	D	K	A	T	R	L	D	R	F	E	P	R	L	N	E	A	N	P	G	D	K	R	O	T	T	T	P	N	A	M	V	180
<i>VHH</i>	121	M	S	D	N	T	A	A	N	I	V	L	R	S	I	G	G	R	-	G	V	T	T	F	L	R	S	I	G	D	K	A	T	R	L	D	R	F	E	P	R	L	N	E	A	N	P	G	D	K	R	O	T	T	T	P	N	A	M	V	179	
<i>V.parahaemolyticus</i>	121	M	S	D	N	T	A	A	N	I	V	L	N	E	I	G	G	P	K	-	A	V	T	Q	F	L	R	S	I	G	D	K	A	T	R	L	D	R	L	E	P	R	L	N	E	A	K	P	G	D	K	R	O	T	T	T	P	N	A	M	V	179

			190	200	210	220	230	240																																																					
<i>KV3</i>	180	T	S	L	N	T	I	L	L	Q	D	G	L	S	E	K	N	Q	T	L	L	T	W	K	N	K	I	S	D	S	L	I	R	S	I	L	P	Q	G	W	S	I	A	D	R	T	G	A	G	E	Q	G	S	R	A	I	N	A	239		
<i>V.fischeri</i>	180	Q	T	L	N	A	L	L	F	G	N	T	L	N	P	Q	D	E	Q	T	L	K	S	M	M	N	K	Y	S	D	P	L	L	R	S	I	L	P	N	N	W	S	I	A	D	R	S	G	A	G	G	F	G	S	R	G	I	T	A	239	
<i>VHV</i>	181	N	T	L	H	T	L	L	E	G	D	A	L	S	Y	E	S	R	I	Q	L	K	I	W	Q	D	N	K	Y	S	D	S	L	M	R	S	V	L	P	K	G	W	S	I	A	D	R	S	G	A	G	G	F	G	S	R	G	I	T	A	240
<i>VHH</i>	180	N	T	L	H	T	L	L	E	G	D	A	L	S	Y	E	S	R	I	Q	L	K	I	W	Q	D	N	K	Y	S	D	S	L	M	R	S	V	L	P	K	G	W	S	I	A	D	R	S	G	A	G	G	F	G	S	R	G	I	T	A	239
<i>V.parahaemolyticus</i>	180	N	T	L	H	T	L	M	E	D	N	A	L	S	Y	E	S	R	T	Q	L	K	I	W	Q	D	N	K	Y	S	D	S	L	M	R	S	V	L	P	K	G	W	S	I	A	D	R	S	G	A	G	N	Y	G	S	R	G	I	S	A	239

			250	260	270	280	290																																														
<i>KV3</i>	240	L	V	W	N	E	O	H	K	P	I	I	S	L	Y	L	T	H	T	E	L	D	I	A	O	R	N	G	T	L	N	G	V	A	K	L	V	L	E	H	F	S	V	E	-	-	-	-	-	-	-	-	283
<i>V.fischeri</i>	240	A	Y	W	N	D	K	H	O	P	I	I	S	T	Y	L	T	Q	T	K	L	D	M	A	E	R	N	Q	V	I	V	E	V	G	N	A	T	F	N	E	F	N	I	N	-	-	-	-	-	-	-	283	
<i>VHV</i>	241	M	I	W	K	E	N	H	K	P	V	Y	S	I	Y	I	T	E	T	D	L	S	L	Q	A	R	D	Q	V	I	A	Q	V	S	Q	L	I	L	D	E	V	Q	Y	L	A	L	A	K	Y	290			
<i>VHH</i>	240	M	I	W	K	E	N	H	K	P	V	Y	S	I	Y	I	T	E	T	D	L	S	L	Q	A	R	D	Q	V	I	A	Q	V	S	Q	L	I	L	D	E	Y	N	T	-	-	-	-	-	-	283			
<i>V.parahaemolyticus</i>	240	M	I	W	K	D	N	Y	K	P	V	Y	S	I	Y	V	T	O	T	D	L	S	L	Q	A	R	D	Q	L	I	A	G	I	S	Q	L	I	L	E	H	Y	K	E	-	-	-	-	-	-	283			

Fig. 3. Alignment and comparison of the β -lactamases family proteins from *V. alginolyticus* KV3 and various NCV β -lactamases.

3) KV3 β -lactamase gene의 distribution

- KV3 β -lactamase gene이 한국의 여러 지역의 해수와 어류에서 분리한 , *Vibrio* spp. 일본과 중국에서 각각 수입한 참돔, 농어에서 분리한 *Vibrio* spp. 에 얼마나 분포하는지를 알아보기 위하여 KV3 β -lactamase gene을 특이적으로 검출하는 primer를 제작하여 PCR 방법으로 알아보았다. 한국, 일본, 중국에서 각각 100개, 30개, 50개의 *Vibrio* spp.를 분리하였고 이를 실험에 사용하였다. 그 결과 넙치에서 분리한 3개의 *Vibrio* spp.에서 특이적인 PCR 산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 또한 이들의 β -lactam 항균제에 대한 MIC 값을 비교해 본 결과 penicillin 계열에만 내성을 나타내었고 cephalosporins에는 감수성이 있는 것으로 나타났다 (Table 5).

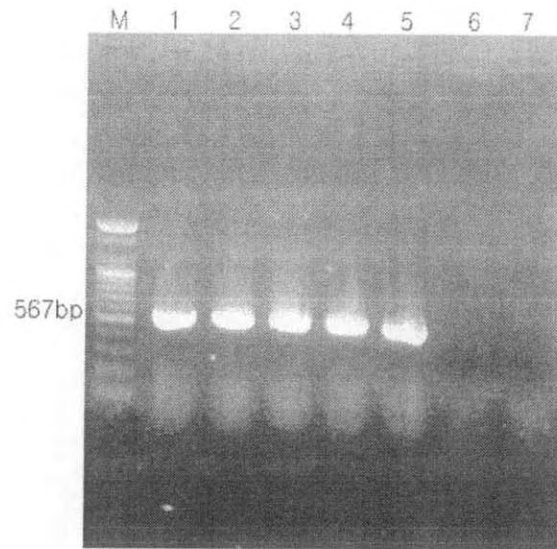


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of products obtained by PCR with the primer for KV3 β lactamase gene. Lanes: M, molecular mass marker(Bioneer), 1, KV3; 2,RV16; 3,YV1; 4, JDV11; 5, *E. coli DH5a* (*pHSG398.KV3*); 6, YV1 Conjugant; 7, RV16 Conjugant.

Table 5. MICs of β -lactams for *E. coli* DH5 α cells harboring recombinant plasmid pHSG398.KV3 and environmental *Vibrio* spp.

β -lactam	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$) of drug						
	<i>E. coli</i>			<i>Vibrio</i> spp.			
	DH5 α	pHSG398	pHSG398. KV3	YV1	RV16	JDV11	KV3
AMP	≤ 8	≤ 8	1024	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048
PIP	≤ 8	≤ 8	256	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048
AMC	≤ 4	≤ 4	64	128	128	128	64
CPL	16	32	16	≥ 256	128	128	128
CFR	8	16	8	64	64	64	64
CFM	≤ 1	≤ 1	32	8	16	8	16
CFD	16	8	16	32	32	32	64
FOX	4	8	8	128	128	128	128
CFX	≤ 0.03	≤ 0.03	≤ 0.03	2	0.5	0.25	0.5
CAZ	1	1	4	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16
CFA	≤ 0.06	≤ 0.06	≤ 0.06	2	0.5	0.5	1

4) SDS-PAGE and IEF

- KV3 β -lactamase gene에 대해서 SDS-PAGE와 IEF를 실시하였다. 그 결과 wild type에서는 β -lactamases 성상을 확인할 수 없었지만 KV-1 gene을 cloning한 *E. coli* DH5 α (pHSG398.KV3)에서는 β -lactamases의 특징을 알 수 있었다. 결과 분자량은 34-35kDa이었고 pI치는 4.9-5.3으로 나타났다 (Fig. 5).

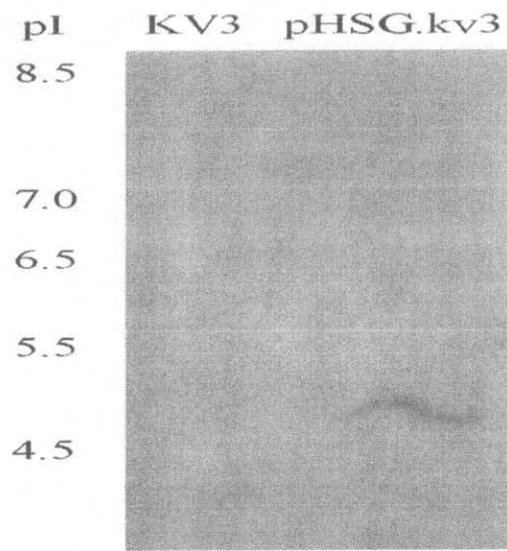


Fig. 5. IEF (Isoelectric Focusing) of KV3 β -lactamase gene.

4. 결 론

- *Vibrio* spp.의 β -lactam 계열 항균제 MIC 값과 β -lactamase을 확인 해 보았다. 먼저 동해안, 남해안, 제주도의 해수와 병어의 환부, 그리고 정상어의 장에서 TCBS 한천 배지를 이용하여 120개의 *Vibrio* spp.를 분리하였다. 그리고 일본과 중국에서 수입된 참돔과 농어의 장에서 *Vibrio* spp.를 각각 30개와 50개를 분리하였다. *Vibrio* spp.에 있어서 ampicillin 내성 비율은 30-98%라고 알려져 있다 (Ottaviani, et al. 2001). 본 연구에서도 ampicillin에 대해서 80%의 내성 비율이 나타났으며 광범위 β -lactam 항생제에도 높은 MIC를 나타내는 6개의 *Vibrio* spp.도 존재하였다. 비브리오에서의 β -lactamase에 대한 연구는 주로 *Vibrio cholerae*에 연구되어지고 있다. 특히 비브리오 과에 속하는 어병 세균에 있어서는 *Vibrio harveyi*에서 확인된 VHH-1, VHW-1 gene만이 보고되어 있다 (Teo et al., 2000). *Vibrio* spp.에서 PCR방법으로 TEM, SHV gene을 확인하려는 방법은 시도되었으나 gene의 존재를 확인하지 못하였다 (Zanetti et al., 2000). 본 연구에서도 한국의 여러 지역과 중국, 일본에서 수입한 어류에서 분리한 *Vibrio* spp.에 있어서 blaTEM, blaSHV gene에 대해서 조사하여 보았다. 하지만 Zanetti et al. (2000)와 마찬가지로 *Vibrio* spp.에서 TEM, SHV gene을 확인하지 못하였다. 그리고 또한 *Vibrio harveyi*와 *Vibrio fischeri*, *Vibrio parahaemolyticus*에서 확인된 β -lactamase gene을 기초로 각각의 gene에 대한 특이적인 primer를 제작하여 확인하여 보았지만 그 어떤 gene도 *Vibrio* spp.에서 확인하지 못하였다 (data not shown). 따라서 본 연구에서 사용된 *Vibrio* spp.가 어떠한 β -lactamase를 갖는지를 확인하기 위해서 *Vibrio* spp.의 β -lactamase gene을 제한 효소 처리하여 cloning 하였다. 그 결과 KV3 균주에서 현재까지 알려지지 않은 새로운 β -lactamase gene이 cloning 되었다 (Fig. 1). KV3은 Vitek GNI+ CARDS (Biomerieux Inc.)에서 *Vibrio alginolyticus*로 동정되었다. *Vibrio alginolyticus*는 수중 환경에 널리 분포하는 그람음성 간균으로 saprophytic microbiota로 알려져 있다 (Carli et al., 1993). 그리고 또한 어류

및 패류, 갑각류에 병원성을 나타낸다고 알려져 있다 (Lee, 1995; Rikelmn et al., 1996). 또한 *Vibrio alginolyticus*는 ampicillin에 대해서 높은 내성을 나타낸다고 보고 되어져 있다 (Zanetti et al., 2001; Ottaviani et al., 2001). KV3의 β -lactamase gene은 class A β -lactamase의 특징이 되는 몇 가지 중요한 motif를 가지는데 (Fig. 1), 62번째에서 66번째에 위치한 Ser - X - X - Lys 은 PBP(Penicillin Binding Protein) 와 serine β -lactamase의 중요한 특징이다 (Jois et al., 1991). 다음으로 122-124번째에 위치한 SDN loop와 158번째에 위치한 Glu 또한 class A β -lactamase의 중요한 특징이다. 마지막으로 VHH-1, VHW-1, 그리고 *Vibrio fischeri*에서는 226-228번째에 RSG가 나온다고 알려져 있지만 본 연구에서 확인된 β -lactamase에서는 RTG가 나왔다. 현재까지 알려진 β -lactamase는 200여가지가 넘는다. 이 중 class A에 속하는 β -lactamase이면서 그람 음성 균에 보편적으로 많이 존재하는 TEM, SHV와 *Vibrio spp.* 에서 확인된 여러 β -lactamase를 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 에서 찾아 KV3 β -lactamase와 비교해 보았다. 그 결과 TEM, SHV와 각각 38%, 36%의 낮은 amino acid identity를 나타냈다 (Table 4). 그리고 또한 *Vibrio spp.*에서 확인된 여러 β -lactamase와도 낮은 identity를 보여주었다 (Table 4). 여러 β -lactamase와 계통수를 비교해 보았을 때 KV3 β -lactamase gene은 *Vibrionaceae* 과의 β -lactamase 에 속했지만 *Vibrio cholerae* 의 β -lactamase 보다는 NCV에 속하는 β -lactamase와 가까웠으며 계통 발생학적으로 보았을 때 NCV의 β -lactamase 중에서 초기의 gene이라 여겨진다 (Fig. 2, 3). KV3 β -lactamase gene의 promoter는 10 부위가 TATAAT 35 부위가 CTCAGA로 *Vibrio fischeri* β -lactamase gene 과 10 부위는 일치하지만 35부위는 TTGACT인 *Vibrio fischeri* 와 완전히 달랐다. 그리고 여러다른 β -lactamase gene의 promoter와 비교해 보았을 때 다른 promoter sequence 를 가지고 있었다 (data not shown). KV3 β -lactamase gene과 다른 *Vibrio spp.*에서의 β -lactamase gene을 비교하여 KV3 β -lactamase gene에 특이적인 primer를 제작하여 KV3 β -lactamase gene이 *Vibrio spp.*에 얼마나 분포하는지 알아보았다. 200개의 *Vibrio spp.* 중 3개에서 특이적인 PCR band가 확인

되었다 (Fig. 4). 이들 균주는 *Vibrio alginolyticus*와 *Photobactrium damsella*로 동정되었다. 따라서 KV3 β -lactamase gene은 *Vibrio alginolyticus*에만 존재하는 것이 아니라 다른 *Vibrio* spp.에서도 존재함을 알 수 있었지만 이 gene의 분포는 매우 낮다는 것을 또한 확인 하였다. KV3 β -lactamase gene의 위치에 있어서 RV16과 YV1의 conjugant에서 특이 primer로 PCR을 하였을 때 이 gene을 확인하지 못하였다 (Fig. 4). 이 결과는 이 gene이 chromosomal이나 이동성이 없는 DNA에 위치함을 암시하며 그리고 또한 KV3 β -lactamase gene 이외의 다른 β -lactamase gene이 R-plasmid에 존재함을 의미한다. KV3 β -lactamase gene에서의 IEF 결과 wild type에서는 nitrocefin에 반응하지 못했고 KV3 β lactamase gene을 cloning한 *E. coli*에서 insert β -lactamase를 확인 할 수 있었다. 이 결과의 차이는 각각의 균에서 gene의 위치가 서로 다르고 그 결과로 gene copy 수에 차이가 생겨서 나온 결과로 여겨진다.

Vibrio spp. 에서의 β -lactam 항생제 MIC 결과에서 3세대 cephalosporins인 cefotaxime과 ceftriaxone에 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 보이면서 clavulanic acid에 억제가 되는 1 균주를 찾아냈다. ESBL이 의심되어 ESBL test를 이중 디스크 확산법 (Double disk synergy test) 으로 실험 하였는데 특이적인 synerism을 확인하지 못하였다. 이것은 이 균주가 ESBL이 아니거나 혹은 실험 방법에 있어서 ESBL 검출법이 대부분 *E. coli*나 *Klebsiella* sp. 에 적용하는 방법이기 때문에 *Vibrio* spp.에서는 다른 변형 된 방법이 필요할 수도 있다. 한편 *Enterobacter cloacae* 의 ESBL 검출에는 *E. coli*나 *Klebsiella* sp. 의 ESBL test를 약간 변형해서 하기도 한다 (Sturenburg, 2004; Schwaber et al., 2004). 따라서 *Vibrio* spp. 에서의 ESBL 검출법에 대해서도 앞으로 연구가 더 필요하다.

제 2 절 *Edwardsiella tarda*에서의 β -lactamase 유전자 조사

1. 총 론

- 어병 세균에 있어서 약제 내성 전달 plasmid와 내성 유전자에 관한 연구는 많이 되어 있지만 (유, 2000; Jun et al., 2004; Aoki, 1988, 1992) β -lactam 계열 항균제에서의 내성 유전자에 대한 정보는 많이 부족한 편이다. 이에 본 연구에서는 어류에 질병을 일으킨다고 알려진 *Edwardsiella tarda*에서 β -lactam 계열 항균제들의 MIC 값을 측정해 보았고 β -lactam 계열 항균제에 내성을 보이는 여러 어병 세균에 있어서 어떤 β -lactamase가 존재하며 그 β -lactamase의 기능에 대해서도 알아보려고 하였다. 또한 다른 계열 항생제의 약제 감수성 실험을 실시하여 이전 어병 세균에서의 결과와 비교 분석 하고자 하였다.

2. 방법 및 결과

가. 내성 균주의 분리

- 1993년부터 2003년까지 동해안, 남해안, 제주 등지에 위치한 양어장의 병어에서 115개의 *Edwardsiella tarda*를 분리 하였고 이 중 12개의 균주가 ampicillin에 $256\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 나타내었다. NCCLS ,1993, 의 장내 세균 내성 기준에 따라 ampicillin에 $32\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 MIC 값을 가지는 것을 내성균으로 결정한 본 실험에서 *Edwardsiella tarda*의 ampicillin에 대한 내성은 10%로 β -lactams 계열 약물에 대해서 감수성이 매우 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1). 또한 JDE41, JDE46, CJE10, CJE14 균주를 제외한 8개 균주는 transformation에 의해서 ampicillin 내성이 *E. coli* DH5a로 옮겨 갔다

(Table. 1). *Edwardsiella tarda*의 β -lactams계열 MIC에서 penicillin 계열은 높은 MIC 값을 나타내었고 또한 amoxicillin/clavulanic acid에서도 256-512 μ g/ml의 높은 MIC 값을 나타내는데 β -lactamase inhibitor에 내성을 나타내는 기전에는 Inhibitor resistant TEM(IRT), AmpC gene, 그리고 TEM-1 gene의 hyperproduction 3가지가 있다. 3세대 cephalosporin 계열에서는 낮은 MIC 값을 나타내고 있지만 cephamycin의 일종인 2세대 cefoxitin에는 50% 가 내성을 나타내고 있었다. 또한 여러 계열의 항균제에 내성을 가지고 있지만 transformant에서는 RE17을 제외한 전체 균주에서 ampicillin 내성 gene만이 단독으로 넘어간 것을 확인 할 수 있다 (Table. 1). Jun et al. (2004)의 연구에서 ampicillin과 tetracycline에 내성을 나타내는 균주에서 tetracycline 내성 유전자의 transformation 실험을 실시하였다. 선택 항생제로 tetracycline을 사용하였을 때 donor cell에서 tetracycline에는 내성을 보였지만 ampicillin에는 내성을 나타내지 않았다. 따라서 ampicillin 내성 유전자는 tet gene이 존재하는 plasmid 상에 같이 존재하는 것은 아닌 것으로 나타났다.

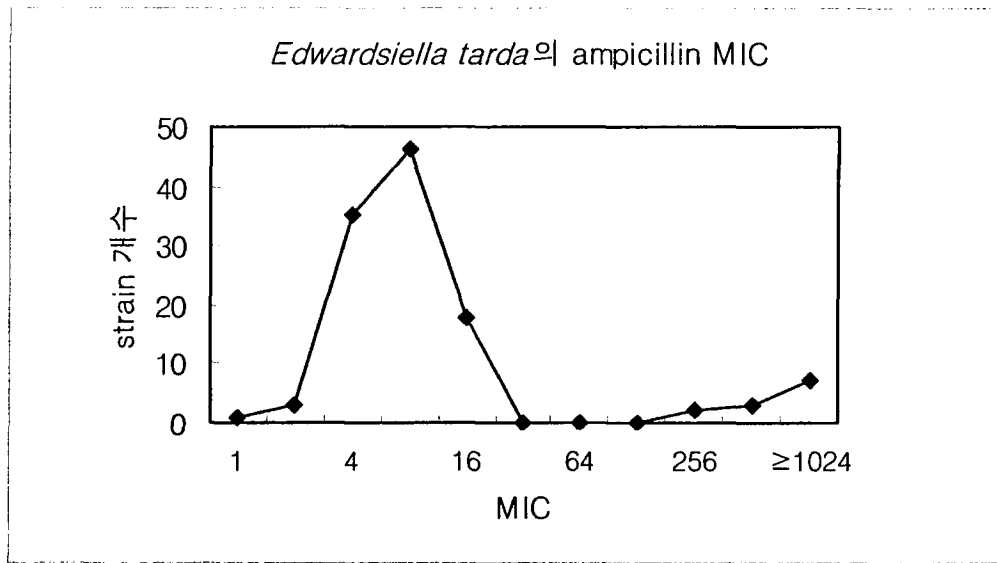


Fig. 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of ampicillin for *Edwardsiella tarda* isolates from Korea.(n=115)

Table 1. MIC of ampicillin resistant *Edwardsiella tarda* and transformants to β -lactam antibiotics.

	P	AMP	PIP	AMC	CPL	CFA	CFR	CFM	CAZ	FOX	CFD	CFX
RE17	512	1024	2048	512	16	2	8	2	4	16	16	1
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
RE21	64	512	512	512	16	4	8	2	4	1	16	1
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	16	4	8	1	32	0.25
JDE17	512	2048	2048	512	16	2	8	2	4	1	16	2
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
JDE18	256	2048	2048	512	16	0.5	8	2	4	1	128	1
transformant	8	1024	32	512	32	≤ 0.06	4	4	8	1	32	0.25
JDE20	512	1024	1024	512	16	1	8	2	4	64	16	0.5
transformant	8	1024	32	256	32	≤ 0.06	4	4	8	1	32	0.25
YE1	512	2048	2048	512	16	1	8	16	4	32	16	2
transformant	8	2048	512	512	32	≤ 0.06	8	8	8	1	32	0.25
YE2	1024	2048	2048	512	16	2	8	16	4	32	16	2
transformant	8	2048	128	256	32	≤ 0.06	8	4	8	1	32	0.25
YE3	512	2048	2048	512	16	2	8	4	4	1	16	2
transformant	8	1024	32	256	32	0.06	4	4	8	1	32	0.5
CJE10	8	256	64	512	128	0.25	8	2	4	32	16	0.5
CJE14	256	512	512	512	64	2	8	2	4	64	16	2
JDE41	128	256	512	512	16	1	8	2	4	32	16	1
JDE46	512	512	512	512	16	1	8	4	4	1	16	1
E. coli DH5 α	≤ 4	≤ 8	≤ 8	≤ 4	16	≤ 0.06	8	≤ 1	1	4	16	≤ 0.03

나. *Edwardsiella tarda*의 β -lactamase 확인

- *Edwardsiella tarda*의 β -lactamase 생성을 알아보기 위하여 nitrocefin test 를 실시하였다. Ampicillin에 내성을 보이는 모든 *Edwardsiella tarda*는 nitrocefin test에서 positive 결과가 나왔고 따라서 β -lactamase 생성이 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). 이전까지 *Edwardsiella tarda*의 β -lactamase에 대한 연구는 체계적으로 되어있지 않았으며 단지 β -lactamase가 있을 것이라 여겨지고 있었다 (Clark et al., 1991). 따라서 어떤 유형의 β -lactamase가 *Edwardsiella tarda*에 존재하는지를 알아보기 위하여 그람 음성 세균에서 자주 확인되는 blaTEM, blaSHV, blaOXA gene을 특이 primer를 사용하여 PCR 방법으로 확인 해 보았다. 그 결과 12개 실험 균주 중 10개에서 TEM 유형의 특이적인 PCR 산물을 얻었다 (Fig. 3). TEM 유형의 PCR 산물에 대한 sequencing 결과 TEM-1a와 TEM-1b가 각각 확인 되었다 (Table 2). 또한 각각의 transformant에서도 같은 β -lactamase가 확인 되었다 (data not shown). TEM gene의 promoter에는 P3, Pa/Pb, P4, P5 등 4가지 형태가 있다고 알려져 있다 (Lartigue et al., 2002). 이들 promoter는 promoter 부위의 nucleotide가 한 개 내지 두개가 변화 하여 생긴 것으로 P3가 가장 약하고 P5가 가장 강력한 promoter로 알려져 있다. 본 실험에서는 모두 P3의 약한 형태가 나왔다. 모든 *Edwardsiella tarda*에서 SHV와 OXA gene은 확인 하지 못하였고 (Fig. 3), 또한 2개의 균에서는 확인한 모든 β -lactamase 대한 특이적인 PCR 산물이 없었다 (Table 2, Fig. 3). 아무런 β -lactamase gene이 나오지 않은 2개의 ampicillin 내성 균주는 cefoxitin에도 내성을 나타내므로 AmpC gene에 의해서 ampicillin에 내성을 나타낸다고 여겨진다.

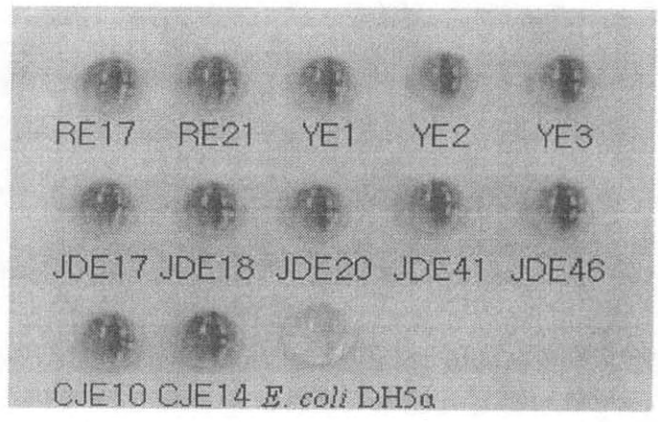


Fig. 2. Nitrocefin test.

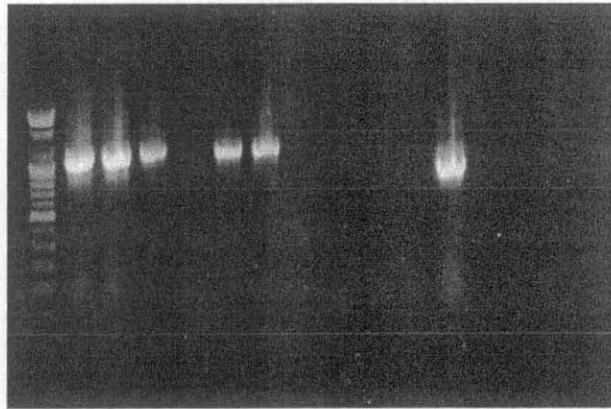


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of products obtained by PCR with the primers for TEM, SHV and OXA genes. Lanes: M, molecular mass marker (Bioneer) ; 1, RE17 ; 2, YE1 ; 3, JDE17 ; 4, CJE10 ; 5, RE17 transformant ; 6, YE1 transformant ; 7, Empty ; 8, RE21 ; 9, CJE14 ; 10, YE1 ; 11, *E. coli* SHV2a , positive control ; 12, Empty ; 13, RE17 ; 14, RE21 ; 15, JDE17.

Table 2. *Edwardsiella tarda* 의 β -lactamase와 promoter

Strain	β -lactamase	Promoter
<i>E. tarda</i> RE17	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> RE21	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> YE1	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> YE2	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> YE3	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> JDE17	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> JDE18	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> JDE20	TEM-1b	P3
<i>E. tarda</i> JDE41	TEM-1a	P3
<i>E. tarda</i> JDE46	TEM-1a	P3
<i>E. tarda</i> CJE10	ND ^a	-
<i>E. tarda</i> CJE14	ND	-

^a: not determined

No reaction result was PCR amplification for TEM, SHV, OXA β -lactamase gene to CJE10, CJE14.

3. 결 론

남해안과 제주에서 양식되는 넙치와 뱀장어에서 분리한 115개의 *E. tarda*에서 ampicillin에 높은 내성을 나타내는 12개의 균을 분리하였다. *E. tarda*에 있어서 ampicillin 내성비율이 10% 정도로 매우 낮게 나타나는데 (Fig. 1) 이것은 김(1999), Stock and Widemann (2001) 의 연구 결과와 유사하다. 하지만 뱀장어 양만장에서 분리한 *E. tarda*에서의 ampicillin 내성이 90%가 나타난다는 보고와는 차이가 크게 났다 (최 등, 1996). 이 차이는 1990년대 중반에 뱀장어 양만장에서 ampicillin을 과다 투여하여 *E. tarda*에서 ampicillin에 대한 내성이 증가 했다고 여겨진다.

한편 Stock and Widemann(2001)는 미국, 독일, 일본 등에서 *E. tarda*를 얻어서 다양한 계열의 항균제에 대한 *E. tarada*의 약제 감수성을 보고 하였는데 이들의 연구결과에 의하면 *E. tarada*는 ampicillin에 2.5%만이 내성을 나타내었으며 benzylpenicillin을 제외한 모든 β -lactam 계열 항균제에 감수성이 있다고 보고하였다.

본 연구에서 ampicillin에 내성을 나타내는 *E. tarda*에서의 β -lactam 계열 항균제 MIC 값은 penicillin 계열에서는 매우 높게 나타났지만 cephalosporins 계열에서는 상대적으로 낮은 MIC 값을 나타내었다. 이것은 *E. tarda*에서의 ESBL gene은 아직 존재하지 않는다는 것을 의미하며 광범위 β -lactam 항균제가 훌륭한 치료제가 될 수 있음을 암시한다. 그리고 AMC에 높은 MIC값을 나타내는데 이것은 IRT (Inhibitor Resistant TEM), AmpC gene 등에 나타날 수도 있지만 TEM-1의 과다생성에 의한 것일 수도 있다 (Brinas et al., 2002). 그런데 IRT가 없고 AmpC의 유도가 일어나지 않은 *E. coli* DH5a의 transformants에서 AMC 에 대한 MIC값이 높으면서 TEM-1 gene이 detection 되는 것으로 볼 때 *E. tarda*는 TEM-1의 과다생성에 의해서 AMC에 높은 MIC 값을 나타내는 것 같다. 물론 donor의 plasmid에는 IRT gene과 TEM-1 gene이 같이 존재하고 있었고 이들 gene이 모두 recipient로 전달되었을 가능성을 완전히 배제할 수는 없다.

그리고 또한 50%의 균주에서 cefoxitin에 내성을 보이는데 이것은 *E. tarda*에서의 ampC gene의 존재를 간접적으로 알 수 있다. AmpC gene은 대부분 chromosomal에 위치하지만 요즘 plasmid mediated ampC gene이 β -lactams 항균제의 내성에 많은 문제가 되고 있다. 하지만 *E. tarda* transformants의 cefoxitin에 대한 MIC 값을 보았을 때 *E. tarda*의 ampC gene은 chromosomal에 위치한 것으로 여겨진다. 이번 실험에서 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda*에서 β -lactamase gene을 확인 하여 보았다.

첫 번째 실험으로 nitrocefin test를 실시하였다. 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda* 모두에서 nitrocefin test positive 반응이 나왔다. 어떤 유형의 β -lactamase가 *E. tarda*에 존재하는지를 알아보기 위하여 그람 음성 세균에 널리 분포되어 있다고 알려진 blaTEM, blaSHV, blaOXA gene에 대한 primer를 제작하여 PCR 방법으로 *E. tarda*에서의 β -lactamase를 확인 하여 보았다. 그 결과 12개의 ampicillin 내성 *E. tarda* 중에서 10개에서 TEM-1 gene이 확인 되었다. TEM-1 gene이 확인된 10개 균주 중 8개 균주에서 transformant가 확인 되었다. 이것으로 TEM-1 gene이 이동성이 있는 plasmid에 존재하는 것을 알 수 있으며 양식 어장에서 ampicillin에 내성을 나타내는 *E. tarda*가 발생할 때 빠른 시간 내에 내성균의 비율이 증가될 수 있음을 예상할 수 있다.

TEM gene의 promoter에는 P3, Pa/Pb, P4, P5 등 4가지 형태가 있다고 알려져 있다 (Lartigue MF et al., 2002). 이것은 promoter 부위의 nucleotide가 한 개 내지 두개가 변화 하여 생긴 것으로 P3가 가장 약하고 P5가 가장 강력한 promoter로 알려져 있다. 본 연구에서 *E. tarda*에 확인된 TEM-1 gene은 모두 P3의 약한 promoter를 가지고 있었다. TEM-1 gene을 가지는 대부분의 장내 세균에 있어서 P3 promoter를 가지는 것으로 보고되어져 있다 (Brinas et al., 2002).

제 3 절 *E. tarda*의 quinolone계 항생제에 대한 내성과 관련 유전자의 cloning과 특성분석

1. 총 론

현재 우리나라 수산업에 사용되는 quinolones는 nalidixic acid, oxolinic acid, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin등이 있으며, *E. tarda*를 포함하는 세균성 질병의 치료에 사용되고 있다. 하지만 우리나라에서는 다른 선진국에 비해 항생제에 대한 규제 및 내성균의 원인에 대한 연구가 부족한 실정이다. 특히 *E. tarda*의 약제 감수성에 관여하는 몇몇의 보고가 있었지만 (최와 김, 1994, 1996), quinolone 계열 항생제의 내성균에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 그러므로 본 연구에서는 우리나라 양어장의 병어로부터 분리한 *E. tarda*로부터 quinolones의 내성을 조사하고 내성 획득의 원인과 관련 유전자에 대한 유전적 특성을 구명하고자 하였다.

2. 방 법

가. 실험 균주

1994년부터 2003년까지 우리나라 양식장들의 병어로부터 분리한 *E. tarda* 균을 수집하여 각종 시험 약제에 대한 내성균을 찾고자 하였다. *E. tarda* 균은 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하고 세균의 16s rRNA gene의 특이적인 primer를 이용한 PCR 결과, 특이적인 생성물을 증폭하는 균으로 규정하였다. *E. tarda* 균의 분리 및 증균용으로는 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco)나 Tryptic Soy Agar (TSA, Difco)를 사용하였으며 필요에 따라 1%의 NaCl을 첨가하여 배양하였다. 병어로부터 분리된 *E. tarda* 균주는 25℃에서 16시간 배양한 후, 균수를 측정하기 위하여 spectrophotometer (UVIKON, KONTRON INSTRUMENTS, S.P.A,

Milan, Italy)를 이용하여 OD₆₀₀값을 구한 후 실험에 사용하였다. 또한 실험균은 보관을 위해 TSB 배양액에 20% glycerol (Sigma)를 첨가한 후 -70℃에서 보관하였다.

나. 약제 감수성 시험 및 Nalidixic acid 내성균 분리

본 실험에서 사용한 항생제는 ampicillin (Am), tetracycline (TC), nalidixic acid (Na), oxolinic acid (OA), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP) 등이며, 모두 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 채집 균주의 항생제에 대한 내성 정도는 김. (1997)에 따라 MIC (minimum inhibitory concentration) 값으로 나타내었으며, broth dilution method를 사용하여 측정하였다.

다. Total DNA 분리

TSB에 25℃ 또는 37℃, 24시간 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 취하여 phenol extraction 법을 이용하여 분리하고 UV spectrophotometer로 260nm에서 흡광도를 측정하여 다음 각각의 DNA 농도를 정량하여 실험에 사용하였다.

라. DNA gyrase subunit (*gyrB*, *parC*, *parE*) gene 염기 서열 분석

실험균주는 채집균주 중 quinolones에 감수성을 보이는 *E. tarda* GE1을 사용하였으며 유전자의 염기 서열 결정은 세 단계로 행하였다. 먼저 유전자의 *gyrA*의 QRDR 서열을 결정하고, 그런 다음 이 서열의 flanking sequence를 결정함으로써 전체 유전자의 염기 서열을 결정하였다. 이후 유사한 방법으로 *gyrB*를 결정하였다. *parC* 유전자는 *gyrA*의 QRDR 결정 과정에서 확인하였고, *parE*의 유전자는 *parC*의 5' end extension에서 그 위치와 존재를 그리고 location까지 확인하는 방법을 사용하였다.

1) Primer 제작 및 PCR

본 제작의 특성은 Primer의 제작 과정에 있어 DGYR-1과 DGYR-3가 *gyrA* gene 뿐만 아니라 *parC*와도 상응하게 하여 두개의 gene을 동시에 cloning 할 수 있게 하였으며, DGYR-2, DGYR-4과 DGYR-5은 *gyrA* gene에만 특이적으로 하여 *gyrA* 와 *parC*를 분리하여 분석할 수 있게 하였다.

E. tarda GE1의 *gyrA* QRDR을 확인하기 위해 이전에 보고된 논문을 참조하여 degenerate된 4개의 sense primer와 2개의 antisense primer를 제작하였다 (Musso et al., 1996; Okuda et al., 1999) (Table 1). 위의 primer (Table 1)를 사용하여 *E. tarda* GE1 genomic DNA에 적용한 결과, 기대했던 PCR 산물이 생성되지 않았다. 그래서 아미노산 배열의 상동성으로부터 제작되었던 이전의 degenerate primer (Table 1)와는 다르게 *E. coli*, *Aeromonas salmonicida*, *Erwinia carotovora*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahaemolyticus* (GenBank accession number respectively : X57174, L47978, X80798, X16817, U08817, AE006122, L29417, U56906, AB023569)의 *gyrA* gene의 가장 보존된 부위의 염기 서열로부터 다시 유추하였다 (Table 2).

PCR을 실시하여 얻은 PCR 산물은 vector (pCR 2.1-TOPO, Invitrogen)로 cloning한 다음, Big dye terminator cycle DNA sequencing kit (ABI PRISM, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 automatic sequencer를 사용하여 염기 서열을 밝혔다.

Table 1. Oligonucleotide primers used in other laboratory (Musso et al., 1996; Okuda et al., 1999)

Primer	Direction	Positions ^a	Base Sequence
VGYR1-S	Sense	GyrA, 41-46; ParC, 43-48	5-T(ACGT)AA(AGCC(ACGT)CA(CT)ACG)3
VGYR2-S	Sense	GyrA, 57-62	5-AA(CT)G(CT)TCGAA(CT)AA(AG)GCG-3
VGYR3-S	Sense	ParC, 78-83	5-AA(AGTA(CT)CA(CT)CC(ACGT)CA(CT)G)3
VGYR4-S	Antisense	GyrA, 124-119; ParC, 127-122	5-TC(ACGT)G(AGTA(ACGT)CCT)CAT(ACT)CC-3
G1-S	Sense	GyrA, 21-28	5-TGGATTATCCGATG(A)TCG(CGG)3
G2-R	Antisense	GyrA, 127-120	5-GA(CT)ACCGT(AAG(CT)TTCCG)ATAACG3

^a The position of VGYR1-S, VGYR2-S, VGYR3-S, VGYR4-S, G1-S, G2-R degenerate primers correspond to amino acid residues of *E. coli* GyrA and ParC.

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study for QRDR region of *gyrA*

Primer	Direction	Positions ^a	Base Sequence
DGYR-1	Sense	<i>gyrA</i> , 220-236, <i>parC</i> , 211-227	5-AT(GCG)GTA(A)GTA(CT)CACCC-3
DGYR-2	Sense	<i>gyrA</i> , 316-332	5-CA(A)GCC(CT)AACTTCG(CT)TC-3
DGYR-3	Antisense	<i>gyrA</i> , 536-517, <i>parC</i> , 511-530	3-CCCAT(A)GCC(GTC)AC(GTC)CC(A)GATACC-3
DGYR-4	Antisense	<i>gyrA</i> , 842-823	3-ACCAG(ATC)TC(A)GCC(A)GAT(CT)TT(CT)TC-3
DGYR-5	Antisense	<i>gyrA</i> , 1088-1069	3-GT(A)CGAC(GTC)ACTTC(A)GCC(A)GCCGTC-3

^a The position of DGYR-1 ~ DGYR-5 degenerate primers correspond to nucleotide sequence of *E. coli gyrA* and *parC*.

2) QRDR의 upstream과 downstream 염기 서열 구명

QRDR (*parC*, *parE* 그리고 *gyrA* 및 *gyrB*)의 upstream과 downstream sequence를 구명하기 위해 cassette ligation-mediated PCR 기법을 이용하였다. 이 PCR법은 염기 서열을 알고 있는 기지의 DNA 영역으로부터 미지 영역의 염기 서열을 증폭해나가는 방법이다.

가) Cassette ligation-mediated PCR의 template DNA 준비

E. tarda DNA (2.5 μ g)를 분리하여 30 unit의 제한효소를 처리하였다. 제한효소로 처리된 DNA는 ethanol로 침전시킨 후 ligation 반응물 (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)을 첨가하였다. ligation을 위한 시약으로는 ligation solution I, 15 μ l, ligation solution II, 7.5 μ l, 그리고 DNA 절단에 사용된 제한효소에 상응하는 cassette가 첨가되었다. 그 후 16 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 ligation된 nucleic acid를 다시 저온의 ethanol 200 μ l에 침전시켰다. 다음으로 94 $^{\circ}$ C에서 10분간 heating하여 ligase를 inactivation한 다음 이를 template로 하여 cassette ligation-mediated PCR을 manufacture의 지시에 따라 실시하였다. 이 실험에서 사용된 제한효소는 *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *XbaI*, *Sau3A I* 이며, 각각의 제한효소가 처리된 DNA 혼합물을 준비하였다.

3) Cloning

가) Gel elution

PCR 생성물을 , Pre-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose로부터 분리·정제하였다.

나) Cloning

정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning하였다.

다) Plasmid 분리

배양된 blue/white colonies 중에서 white colony를 취해, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 뒤 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 후 1.5ml을 microtube에 옮기고 plasmid 분리 kit (Bioneer.Com.)를 사용하여 분리한 후 TE buffer 50 μ l에 현탁하여 염기 서열을 분석하는데 사용하였다.

3. 결 과

가. 내성균 분리 및 분석

1993년부터 2003년까지 동해안, 남해안, 제주 등지의 marine environment에서 분리한 *E. tarda*는 Amp, Tc 및 OA에 대하여 높은 내성 비율을 보여 주는 것을 여러 실험을 통하여 확인할 수 있었다 (Jun et al., 2004). 이 중 NA에 내성을 보이는 균주는 총 136균주 중 52균주로 38%로 나타났으며 이들은 NA 뿐만 아니라 다른 quinolones에도 다양한 내성치를 보였다 (Table 4). Quinolone 내성 획득에 있어 plasmid와의 관계를 알아보기 위해 몇몇의 채집균을 선택하여 Plasmid 분리 후, transformation 실험을 실시하였다. 결과 test된 모든 *E. tarda*는 plasmid를 가지고 있지 않아 transformation이 되지 않거나, transformation 후 분리된 plasmid는 *gyrA* gene을 가지고 있지 않았다. 그러므로 quinolone의 내성에는 plasmid가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

다양한 source로부터 분리한 *E. tarda*의 내성 비율을 포괄적으로 Table 3에 표시하였다.

Table 3. Quinolone resistant isolates in Korea

Name	History	MIC ^a (after 1 day)					
		NA	OA	NOR	CIP	AMP	TC
RED7	1994, Yosu	≥ 480	2	0.31	0.08	2.5	-
RED8	1994, Yosu	≥ 480	1	0.31	0.08	5	-
RE1	1995, Kwangju	60	0.5	0.08	0.04	10	15
RE7	1995, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	2.5	-
RE8	1995, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	10	-
LE2	1995, Namhae	≥ 480	2	0.31	0.16	1.25	-
LE3	1995, Namhae	240	1	0.63	0.08	0.63	-
JH4	1996, Tongyoung	≥ 480	1	0.16	0.08	2.5	-
CH1	1997, Kujedo	60	0.5	0.31	0.08	5	0.94
DH1	1997, Kujedo	120	1	0.63	0.08	5	0.94
KY1	1997, Kujedo	240	1	0.63	0.08	5	0.94
RE12	1998, Pohang	≥ 480	4	0.31	0.08	-	-
RE23	1998, Pohang	60	0.5	0.08	0.04	2.5	30
JH9	1999, Tongyoung	≥ 480	2	0.16	0.08	5	-
JDE1	2000, Yosu	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE2	2000, Yose	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE15	2000, Tongyoung	240	1	0.63	0.08	5	30
JDE21	2000, Tongyoung	240	0.5	0.31	0.08	5	-
JDE23	2001, Namhae	240	1	0.63	0.08	10	0.94
JDE27	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	10	15
JDE28	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	5	30
JDE29	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	10	30
JDE30	2001, Namhae	240	1	1.25	0.08	5	60
JDE31	2002, Kuryoungpo	240	1	1.25	0.08	5	60

Table 3. Continued

Name	History	MIC ^a (after 1 day)					
		NA	OA	NOR	CIP	AMP	TC
JDE32	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	20	60
JDE33	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	20	30
JDE34	2002, Kuryoungpo	≥ 60	2	1.25	0.31	10	≥ 60
JDE36	2002, Kuryoungpo	≥ 60	4	-	0.63	20	30
JDE37	2002, Kuryoungpo	≥ 60	4	1.25	0.63	20	≥ 60
CJE1	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE2	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE3	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE4	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE5	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE6	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE7	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE8	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE9	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE10	2003, Jejudo	60	1	0.03	0.13	≥ 1024	512
CJE11	2003, Jejudo	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE12	2003, Jejudo	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE13	2003, Jejudo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
CJE14	2003, Jejudo	60	1	0.06	0.06	≥ 1024	256
CJE15	2003, Jejudo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
JDE38	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.13	0.06	8	16
JDE39	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.25	0.13	8	16
JDE40	2003, Kujedo	240	2	0.25	0.13	8	32
JDE41	2003, Kujedo	≥ 480	2	0.5	0.25	8	128

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin CIP, ciprofloxacin; AMP, ampicillin; TC, tetracycline

Table 4. Proportion of antibiotic resistant *E. tarda*

Target bacteria	Target bacteria were isolated from :	Antibiotics			
		TC	Amp	QA	NA
<i>E. tarda</i>	Total <i>E. tarda</i> from marine environments	15.7 ^a (20/127) ^b	10.4 (12/115)	—	38 (52/136)
	NA resistant <i>E. tarda</i> from marine environment	59.6 (31/52)	13.5 (7/52)	53.8 ^c (28/52)	100 (136/136)

Concentration of antibiotics in TSA plate used for the isolation of resistant bacetria: TC 16ug/ml, Amp 16ug/ml, NA 60ug/ml, QA 2 ug/ml

^a: percentage

^b: numbers of isolates

^c: all these bacteria showed more than 1 ug/ml of MIC value

나. *GyrA* gene의 QRDR 염기 서열 결정

Nucleotide 수준에서 제작한 primer (Table 2)를 이용하여 *E. tarda* genomic DNA에 PCR 증폭을 실시한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. DGYR-1와 DGYR-4의 primer로 *gyrA* QRDR에 대해서는 623 bp, 그리고 DGYR-1, DGYR-3의 primer로 *parC* gene에 대해선 320 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다. *gyrA* gene에 특이적이었던 623 bp PCR 산물의 염기 서열을 분석한 결과, 다른 그람 음성 세균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 보여주었으므로 *E. tarda*의 *gyrA* gene임을 확인할 수 있었으며, 이에 대한 결과는 이미 다른 보고서에서 보고 한 바가 있다 (Shin et al., 2005).

그리고 그람 음성 세균의 *gyrA*와 *parC* gene 모두에서 검출 가능했던 320 bp PCR 산물을 cloning하여 염기 서열을 밝힌 결과, clone I에서는 다른 그람 음성 세균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 보여준 반면, clone II에서는 *parC* gene과 매우 높은 상동성을 나타내었다.

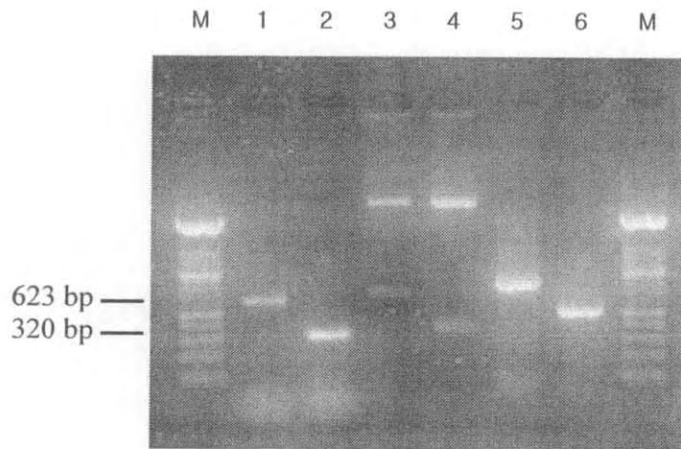


Fig. 2. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of *gyrA* and *parC* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *gyrA* (623 bp); lane 2, *parC* (320 bp); lane 3, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert 623 bp); lane 4, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert 320 bp); lane 5, *gyrA* with M13 primer; lane 6, *parC* with M13 primer. Lane M, DNA marker (100 bp ladder).

다. *parC*, *parE*, *gyrB* gene의 염기 서열 분석

Quinolone 내성균들에 있어서 *gyrA* gene의 QRDR 염기 서열 분석 결과, 동일한 변화를 보이는 균주들이 다양한 MIC 값을 보임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 quinolone 항생제에 대한 내성 획득에 있어 *gyrA* gene 이외의 다른 유전자가 관여함을 나타내는 것으로 다음 실험으로 다른 내성 유전자로 알려진 *parC*, *parE*, *gyrB* gene의 염기 서열 및 내성균에 있어서의 이러한 유전자의 변이를 확인하고자 하였다.

1) *parC* gene의 염기 서열 분석

2의 실험 결과, *parC*에 대해 320 bp의 염기 서열을 결정할 수 있었다. 이 염기 서열을 바탕으로 cassette ligation-mediated PCR을 실시하였으며, 결과 upstream에서는 *EcoR* I fragment, downstream에서는 *Xba* I, *Sal* I에 해당하는 fragment를 얻을 수 있었다. 이러한 fragment를 cloning하고 염기 서열을 분석하였으며 전체 *parC* gene을 결정하였다 (Fig. 3). 1607 bp, 686 bp, 2087 bp에 해당하는 각각의 fragment를 분석한 결과 *E. tarda* *parC* gene은 701개의 아미노산을 암호화하는 2106 bp의 ORF를 나타내었다 (Fig. 4). 본 연구의 결과물이 *parC* gene에서 증폭되었는지를 확인하기 위해 QRDR 부위와 gene 전체를 nucleotide와 deduced amino acid 서열로 지금까지 보고된 다른 세균 종의 *parC* gene들과 비교하였으며 결과 *E. tarda*의 *parC* gene을 확증할 수 있었다 (Table 5).

Start codon 앞부분에서 putative promoter 및 ribosome binding site, inverted repeating sequence 또한 확인 할 수 있었으며, stop codon 뒤로도 inverted repeating sequence를 확인할 수 있었다. *E. coli* ParC의 Tyr-120, *P. aeruginosa* ParC의 Tyr-127를 포함하는 AAMRYTE 아미노산 서열이 *E. tarda*의 Tyr-98 부위에서도 발견되었다 (Bébéar et al, 1998; Akasaka et al, 1999).

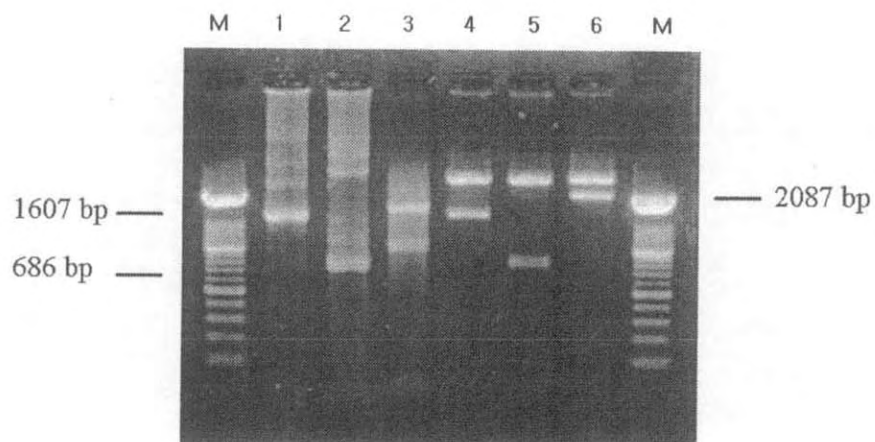


Fig. 3. Electrophoretic analysis of LA PCR products obtained by the amplification of up stream and down stream of *parC* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *EcoRI* digest (nested PCR); lane 2, *XbaI* digest (nested PCR); lane 3, *Sal I* digest (nested PCR); lane 4, 5, 6, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (respectively, insert line 1, 2, 3 fragment). lane M, DNA marker (100bp ladder).

Table 5. Identity of the nucleotide and deduced amino acid sequence of the *parC* in *E. tarda* compared with those in other bacterial strains

Organisms	Accession number ^a	Nucleotide sequence		Deduced amino acid sequence	
		Whole <i>parC</i>	QRDR	Whole <i>ParC</i>	QRDR
<i>Escherichia coli</i>	MS8408	73.5	81.2	77.0	92.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AB003428	68.2	83.1	64.1	89.3
<i>Shigella flexneri</i>	AED15318	71.2	81.5	74.7	92.4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AB023570	62.9	73.9	63.8	84.8
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	U08907	56.9	68.2	41.5	64.1
<i>Serratia marcescens</i>	AF227958	75.5	85.6	77.3	93.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	M68936	72.9	82.6	74.2	92.4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Z67739	50.6	59.4	28.8	51.9
<i>Mycoplasma hominis</i>	AF036961	44.1	54.3	25.8	54.2

^a The nucleotide sequence has been assigned accession number in the GenBank EMBL database.

CAGGCTGAGGGCATTCTGGAGCTCAAGCTGCGTCACCTGGCCCGTCTGGAAGAGGTGAAGATCCGGGGCGAACAGGACGCGCTGGCGCAG 1260
 Q A E A I L E L K L R H L A R L E E V K I R G E Q D A L A Q

GAGCGGGATCGCCTGCAGACGCTGCTGGCTCCGAGCGTAAGCTGGGCACGCTGATCAAGGAAGAGATCATGGCGGATGCCBAAACGTAC 1350
 E R D R L Q T L L A S E R K L G T L I K E E I M A D A E T Y

GGCAGCGCACGGCGTTCCGCGCTGCAAGAGCGTTCTGAAGCGCGGGCGATGAGCGAGCAGACTTTGTCCCGAGCGAACCGGTGACCATC 1440
 G D A R R S P L Q E R S E A R A M S E H D F Y P S E P Y T I

GTCCTGTCCGAAGGGGGCTGGGTGCGCAGCGCCAAGGGGCATGATATTGATCCGAGCGGGCTGAACTATAAGGCCGGCAGCGCTTTCCGC 1530
 Y L S E G G W V R S A K G H D I D P S G L N Y K A G D A F R

GCCGCCCGCGCGGCAAGAGCAACCAGCCGGTGGTCTTTATCGACTCCAGCGGACGCGATATGCCCTCGATCCGCTGACGCTGCCGTCG 1620
 A A A R G K S N Q P V Y F I D S S G R S Y A L D P L T L P S

GCGCGCGGCGAGGGTGAAGCCGCTGACCGTAAAGCTGACGCCGCCCGGGGCAACCATCGAACACGTGCTGATGGCTGCGGACAATCAG 1710
 A R G Q G E P L T G K L T P P P G A T I E H Y L M A A D N Q

AAGCTGCTGATGGCTCCGACGCCGGCTATGGCTTTGTCTGCACCTTTAGCGATCTGGTGGCGTGAACCGCGCAGGCAAGGCCATGCTG 1800
 K L L M A S D A G Y G F Y C T F S D L V A C N R A G K A M L

ACGCTGCCGGAAAATGCCAAGGTGCTGACGCCGCTGGAGATTAACGGTGACGATGACATGCTATTGGCCATTACCGAGGCCGGACGGATG 1890
 T L P E N A K Y L T P L E I N G D D D M L L A I T E A G R M

CTGATGTTCCGGTGCACGATCTGCCGAGCTCTCCAAAGGGCAAGGGGAATAAGATCGTCTCCATCCCCGCGCACAGGCCGCCGCCGGT 1980
 L M F P Y H D L P Q L S K G K G N K I Y S I P A A Q A A A G

GAGGATACGCTGAAATGGCTGCTGGTGGTGGCGCCGACAGACATCGCTGACGCTGCATGTCGGTAAAGCTAAACTGGTATGAAGCCCGCA 2070
 E D T L K W L L Y L A P Q T S L T L H Y G K R K L Y M K P A

GGATTTGCAGAAATTCCGCGCAACCGCGGCCGTAAGGGAAACCTGCTGCCCGCGGGGCTGCAGCGCATTGAGCGGGTGGATGTGGATG +54
 G F A E Y P R E R G P

CGCCCGCAGTCGCTGCGTCTGGACGCCGACGGCAGCGTAATCCAAGGCCGCCAGCGGCCGCCGAAGAGGGCCTGCGCCCGCGCGAC +144
 >>>>>> <<<<<<<

CGCGCCGGGCGTGTGGCCCGCTATTCTGTTTATGAGGTTGTTATGCTATTCATTTCCGGGTCATACTGATCACGCTGCTGTGTCTCGTC +234

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda parC* gene. Potential hairpin loops upstream and downstream of the open reading frame are indicated by the symbols > and < in inverted repeats. Nucleotide position for the restriction enzymes (underlined) and primer (shadowed) used for the preparation of cassette-ligated *E. tarda* DNA and the cloning with cassette ligation-mediated PCR method, and start and stop codon (boxed) respectively also shown.

2) *parE* gene 염기 서열 분석

parC gene의 염기 서열 분석 결과 *parC* gene의 upstream에 *parE* gene의 염기 서열을 확인할 수 있었다. 이렇게 결정된 부분적인 염기서열을 바탕으로 cassette ligation mediated-PCR을 실시하였으며, *Pst*I의 fragment를 얻을 수 있었다. 다음으로 cloning과 염기 서열 분석을 통하여 *parE* gene의 전체 염기 서열을 결정하였다.

Complete gene을 분석한 결과 *parE* gene은 631개의 아미노산을 암호화하는 1896 bp의 ORF를 가지고 있었으며 그 앞 부위에 putative promoter와 ribosome binding sequence를 확인할 수 있었다 (Fig 5). 이 아미노산을 다른 균들과 비교한 결과 *E. coli*의 ParE와는 77.1%의 상동성을 보였다. 그리고 *E. coli*와 *E. tarda*의 GyrB와는 각각 17.7%, 1%의 상동성을 나타내었다. 이 밖에 *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* 그리고 *Streptococcus pneumoniae* 의 *parE*와는 각각 76.2, 57.9, 19.5 그리고 20.8%의 상동성을 보였다. 이러한 아미노산의 비교로 *E. tarda*의 ParE를 보다 확증할 수 있었으며, *Pseudomonas aeruginosa*에서와 같이 G-loop ATP-binding moiety를 포함하는 N-terminal 염기 서열 및 아미노산 EGDSA가 상당히 유사함을 알 수 있었다 (Bébéar et al, 1998; Akasaka et al, 1999).

← PARS4R

```

CGCGCGGGCGTCAAGCTGACCGCGGACGACATCTGGAGCGCTCGCGCTATGCTGGTGGTAAAAATGCAAGATCCGCA GTTTGCCGG 995
P R G V K L T A D D I W E R C A Y V L S V K M Q D P Q F A G

GCAGACCAAGAAGCGCTCTCCTCACGCCAATGCGCTGCCTTGGTCTCGGGGGTGGTCAAAGATGCCTTTAGCCTGTGGCTGAACCAAAA 1085
Q T K E R L S S R Q C A A F V S G V V K D A F S L W L N Q N

CGTGCAGTCCGCGAGCTGCTGGCGAGCTGGCGATAAACAAGCGCCACGCGCGCATGCGGCGGCAAAAGAAAGGTGGTGGTAAGAAAGCT 1175
V Q S A E L L A E L A I N S A Q R R M R A A K K Y V R K K L

GACCAAGCGGGCCCGCTTGC CGGTAAGCTGGCGAGCTGCAAGCGCTCAGGATCTGAAACCGCACGAGCTGTCTCTGGTGAAGGGGATTC 1265
T S G P A L P G K L A D C S A Q D L N R T E L F L V E G D S

GGCGGGGGCTCGGCTAAGCAAGCGCGGAGTCGTGAATATCAGCGGATCATGCGCGTGAAGGAAAGATCCTGAATACCTGGGAGGTCTC 1355
A G G S A K Q A R D R E Y Q A I M P L K G K I L N T W E V S

TTCCGATGAGGTGCTGGCGTCGCAAGGAGGTGCAAGATATTTGGTGGCTATGGGATCGATCCGCAAGAGGATGACCTCAGCCAGCTGG 1445
S D E V L A S Q E V H D I S V A I G I D P D S D D L S Q L R

CTACGGCAAAATCTGTATCCTGGCGATGCGGATTCGATGGACTGCAATATCGCCACGCTGCTGTGGCGCTGTCTGGTCCGCAATTCGG 1535
V G K I C I L A D A D S D G L H I A T L L C A L F V R H F R

CCCCTGGTGCAGGCGGGGCAAGTCTATGTGGCGATGCGCGCGCTGTACCGTATCGATCTCGGCAAGAGGAGTGTCTACGGCCTGAGGGA 1625
P L V Q A G H V V V A M P P L Y R I D L G K E V F Y A L S E

GGAAGAGAAAGCGGGGGTGGTGGAGCAAGCTGAAACGCAAGAAAGGCAACCCCAAGTACAAGCGCTTTAAAGGGCTGGGAGATGAACCC 1715
E E K A G V L E Q L K R K K G K P N V Q R F K G L G E M N P

GCTGCAGCTGCGTGAACCAAGCTGATCCCAATACTCGCGCTCTGGTACAGCTGACCAATGAGGATGAGGATATGAGGCGTACCGTTGC 1805
L Q L R E T T L D P N T R R L Y Q L T I E D E D M E R T V A

CGTCATGATATGCTGCTGGCAAAAAGCGGCGGAGATCGCGCAACTGGCTGCAAGGAAACCGGCAATCTGGCTGAGCTGGAAGTGTGA 1896
V M D M L L A K K R A E D R R N W L Q E N G N L A E L D V *

```

>>>>>

```

CGCATCCCGCCATACATCCGACAGGCTGCCCGCGGGTGGCTGTCTGTTTCTCCTTAAACGGCGCCGCCCTGCGCGACGGCTGTGAC

```

<<<<<<

```

AGTCGGACAAAATAACGTTACTATCGGGGCCATTGCATGATTTTACTGCGATCGTCTGTCTGCGGACAGCGGCGGCTCCAGAGGAT

```

>>>>>> <<<<<<<<

```

GACCAATGAGCGATCTGACTCATGACAACAGTGAGCGTGAGCGCTCCATGCGTTTACTGAGAGAGCCCTATCTGCAATACTCC

```

Fig. 5. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda parE* gene. Potential hairpin loops upstream and downstream of the open reading frame are indicated by the symbols > and < in inverted repeats. Nucleotide position for the restriction enzymes (underlined) and primer (shadowed) used for the preparation of cassette-ligated *E. tarda* DNA and the cloning with cassette ligation-mediated PCR method, and start and stop codon (boxed) respectively also shown.

3) *gyrB* gene의 염기서열 분석

Nucleotide 수준에서 여러 *gyrB*의 conserved region을 이용하여 제작된 primers (UP1, UP2R)를 이용하여 *gyrB*에 대해선 1255 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다. PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과, 다른 그람 음성 세균의 *gyrB* gene과 *parE* gene에 매우 높은 상동성을 보여주었으므로 *E. tarda*의 *gyrB* gene임을 확인할 수 있었다.

일부분의 염기서열 결정 후, upstream and downstream sequence가 결정하였다 (Fig. 6). Upstream sequence에서 922 bp의 *Pst*I fragment, downstream sequence에서는 digest에서만 1172 bp의 *Sal* I fragment을 얻을 수 있었으며, cloning과 염기 서열 분석을 통하여 전체 *gyrB* gene을 결정하였다.

Complete gene을 분석한 결과 *gyrB* gene은 804개의 아미노산을 암호화하는 2415 bp의 ORF를 가지고 있었으며 그 앞 부위에 putative promoter와 ribosome binding sequence를 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

또한 다른 균과의 아미노산을 비교한 결과 *E. coli*의 *parE*와는 74.0%의 상동성을 보였다. 그리고 *E. coli*와 *E. tarda*의 *gyrB*와는 각각 20.3%, 1%의 상동성을 나타내었다. 이 밖에 *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni* 그리고 *Streptococcus pneumoniae parE*와는 각각 47.2, 37.1, 30.4 그리고 14.9%의 상동성을 보였다. 이러한 아미노산의 비교로 *E. tarda*의 *gyrB*를 보다 확증할 수 있었으며, *Streptococcus pneumoniae*에서와 같이 G-loop ATP-binding moiety를 포함하는 N-terminal 염기서열 및 아미노산 EGDSA, YKGL가 상당히 유사함을 알 수 있었다 (Pan and Fisher 1996).

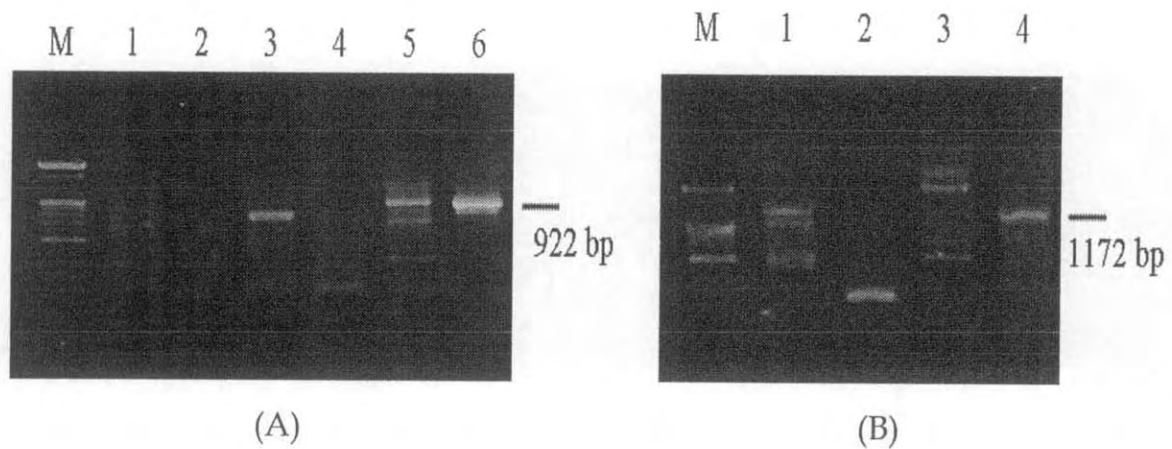


Fig. 6. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of up stream and downstream of *gyrB* partial regions in *E. tarda*. (A), Amplification of upstream *gyrB* partial regions. Lane 1, 2, *Eco*RI digest (first and nested PCR respectively); lane 3, 4, *Xba*I digest (first and nested PCR respectively); lane 5, 6, *Pst* I digest (first and nested PCR respectively); (B), Amplification of downstream *gyrB* partial regions. lane 1, 2 *Pst* I digest (first and nested PCR respectively); lane 3, 4, *Sal* I digest (first and nested PCR respectively). Lane M, DNA marker (100bp ladder).

*Pst*I

GGGCATCAACCGCCTGCCGTTGTGAAACAGGGCCGTCACCAAGGCATCCTGCTGCTGCAGCCAGTTTTTACCGGAGTATGCGCT -560
ATCCTTTTCGTTTATGCGCGGCTGGGATCGCGAAAGCGACTATGCCCGCCTGCTGGAGCGTCACTTTGAGCGCGATCGGGCGCTGACCTA -470
TACCGCGCAGGGGCCGCACAAGGCGGACTTCCGCATCCGCGCCGACGGTACGCCGGTTGAGGATTTGCTGTCGCGGGCAGCTAAAAC -380
GTTGATGTGCGCGCTGCGCCTCGCACAGGGAGAATACCTGACGCGCCACAGCGCCGTCAGTGTCTGTATCTGATCGATGACTTCGCCTC -290
TGAGCTGGATGCCGGCGGGCCGTTTGTCTGCGAAGCGCTGAAAGCCACCGGTGCACAAGTGTGTGTCAGCGCAGTCAACGCCGATCA -200
GGTCGGGACATGGTTGATGAAAAGGGCAAGATGTTCCGCGTGGAACAGGGTAAAAATAGCCGTTTAGATTTCGATTTATTACGATAGTTAT -110
CCAATGGGCGAAGGCTGATG^{SD}**TCAAATACGTATGACTCCTCAAATATCAAGGTATTAAGGGCTGGATGCCGTTTCGTAAGCGCCCGG** 70
M S N T Y D S S S I K Y L K G L D A V R K R P G

GCATGTACATCGGGGATACCGATGATGGTACGGGCTGACCCACATGGTGTGTTGAGGTGGTGGATAACCGGATTGACGAAGCGCTCGCTG 160
M Y I G D T D D G T G L H H M Y F E Y Y D N A I D E A L A G

GTTATTGCAAGATATCATCGTCACCATTACAGTGACAACCTCCGTCTCCGTACAGGATGACGGCCGCGGCATCCCAACCGGCATTCACC 250
Y C K D I I Y T I H S D N S Y S Y Q D D G R G I P T G I H P

CGGAGGAGGGCTCTCTGCCGCC**GGGTCATGATGACCTGCTGACCGGGCGGTAACTGACGATAACTCCTATAAGGTCTCCGGCG** 340
E E G V S A A E V I M T V L H A G G K F D D N S Y K Y S G G

← GYFBS2R ← GYRS1R
GGGTCATGATGACCTGCTGACCGGGCGGTAACTGACGATAACTCCTATAAGGTCTCCGGCG 430
L H G V G V S Y V N A L S E K L E L Y I R R D G H Y H E Q I

TCTACCGACACGGTGTGCCGGCGGCGCCGCTGAAAAGTGGTTGGCGACACCGAGCAGACCGGTACTCGCGTGCCTTCTGGCCGAGCATGG 520
Y R H G V P A A P L K Y V G D T E Q T G T R Y R F W P S M E

AGACCTTCAGCAATGTGGTGAATTCAGTATGACATTCTGGCTAAGCGCTGCGCGAACTCTCTTTCCGAACTCCGGCGTCTCCATCC 610
T F S N Y V E F Q Y D I L A K R L R E L S F L N S G Y S I R

GCCTGCGGATAAACGCAACGATCGCGAAGATCATTCCACTATGAGGGTGGGATTAAGCGGTTTGTGAGTATCTGAACAAGAACAAAA 700
L R D K R N D R E D H F H Y E G G I K A F V E Y L N K N K T

CGCCAATCCATCCGAACGTGTTTTACTTTTCBACCATGAAGGATGATATCGGCGTAGAAGTGGCGCTGCAGTGGAACGATGGCTTCCAGG 790
P I H P N Y F Y F S T M K D D I G Y E V A L Q W N D G F Q E

AGAATATCTACTGCTTTACCAATAACATCCCGCAGCGCGACGGCGGGACCCATCTGGCCGGTTTCCGTGCGGCGATGACCCGTACGCTGA 880
N I Y C F T N N I P Q R D G G T H L A G F R A A M T R T L N

ACAGCTACATGGAAAACGAAGGCTATACCAAGAAGAGCAAAAATCTCCGCTACCGGTGACGACGCGCGTGAAGGGCTAATTGCCGTGGTGT 970
S Y M E N E G Y T K K S K I S A T G D D A R E G L I A V Y S

CCGTGAAGGTGCCGGATCCCAAGTTCTCCTCTCAGACCAAGGATAGCTGGTCTCTTCGGAGGTGAAATCCGCGGTTGAGTCCGCTGATGA 1060
Y K Y P D P K F S S Q T K D K L Y S S E Y K S A Y E S L M N

Fig. 7. Continued.

라. Quinolones 내성 *E. tarda* isolates에서 나타나는 QRDR부위의 mutation 특성 분석

현장에서 분리된 52개의 nalidixic acid 내성균 중 일부 균을 임의적으로 선택하였다. 앞에서 결정된 *gyrA*, *B* 및 *parC* and *E*의 염기 서열을 바탕으로 QRDR 및 일부의 염기 서열을 분석함으로써 내성 획득과 gene의 mutation 특성을 분석하였다. 선택된 모든 균주에서 *gyrA*의 83번 아미노산이 전체적으로 변한 것을 관찰할 수 있었다 (Table 6). 즉 모든 균은 83번 아미노산인 serine이 arginine으로 변이가 일어난 것을 알 수 있었으며 nucleotide는 AGC가 AGA나 CAC로 변한 것을 확인할 수 있었다.

결론적으로 현재 우리나라의 quinolone 계 항생제에 대한 내성은 비교적 제한적인 범위내에서의 genetic 변화에 의하여 이루어지고 있는 것으로 추정 되므로 그 위험성을 조절 할 수 있는 수준에 있다고 사려된다.

Table 6. Susceptibility to quinolones and mutations in the QRDR of *gyrA* genes of *E. tarda* isolates

Strain	Isolation	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a				Mutation in <i>gyrA</i>	
		NA	OA	NOR	CIP	amino acid	base change
GE1	1994, Kujedo	2	0.13	0.03	0.008	83(Ser)	AGC
RED7	1994, Yosu	≥ 512	2	0.31	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
RE1	1995, Kwangju	64	0.5	0.08	0.03	83(Ser→Arg)	CAC
RE8	1995, Pohang	≥ 512	4	0.31	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
LE2	1995, Namhae	≥ 512	2	0.31	0.13	83(Ser→Arg)	AGA
JH4	1996, Tongyoung	≥ 512	1	0.16	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
KFE	1997, Gampo	64	2	0.13	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JH9	1999, Tongyoung	≥ 512	2	0.16	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE2	2000, Yosu	256	1	0.63	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE30	2001, Namhae	256	1	1.25	0.06	83(Ser→Arg)	AGA
JDE37	2002, Kuryongpo	≥ 512	4	1.25	1.25	83(Ser→Arg)	AGA
CJE13	2003, Jeju	≥ 512	2	0.5	0.25	83(Ser→Arg)	AGA
JDE45	2003, Kujedo	≥ 512	4	0.5	0.13	83(Ser→Arg)	AGA

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacin.

마. *In vitro* 변이주의 QRDR region의 mutation 특성 분석

Wild type의 *E. tarda*는 nalidixic acid 및 ciprofloxacin에 총 6단계를 거쳐 내성이 유도되었으며 많은 수의 mutant를 분리할 수 있었다.

항생제가 첨가된 MH agar에서 단계별로 선택된 균들은 MIC test 및 QRDR의 염기 서열이 분석되었고 모든 단계의 변이주들이 *gyrA*의 87번 아미노산이 Asp에서 Gly로의 변이를 보임을 알 수 있었다 (Table 7).

Table 7. Characteristics of quinolone-selected mutants of *E. tarda*

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a						Mutations			
	NA	OA	NOR	CIP	OF	PEF	GyrA		ParC	GyrB
							83	87	58	464
Wild type	2	0.13	0.03	0.02	- ^b	-	Ser	Asp	Ser	Ser
PN-4	64	1	0.13	-	0.25	2	Ser	Gly	Ser	-
PN-B	64	1	0.13	-	0.25	2	Ser	Gly	Ser	-
PC1-2	64	1	0.5	0.13	0.5	4	Ser	Gly	Ser	Ser
PC1-4	64	1	0.5	0.13	0.5	4	Ser	Gly	Ser	-
PC2-3	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	Ser
PC2-5	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	-
PC3-1	128	2	2	0.5	2	8	Ser	Gly	Ser	Trp
PC4-4	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	Trp
PC4-6	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-
PC4-B	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-
PC4-F	512	16	≥ 16	8	≥ 16	≥ 16	Ser	Gly	Ile	-

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; NOR, norfloxacin; CIP, ciprofloxacin; OF, ofloxacin; PEF, pefloxacin.

^b Not determined.

4. 결 론

1994~2003년까지 우리나라 연안의 양어장의 병어로부터 136개의 *E. tarda* 균주를 얻을 수 있었다 (Table 3). 이들 균주 중 nalidixic acid에 대한 내성을 보이는 균들을 선택하여 quinolone 내성 정도를 MIC값으로 나타낸 결과 2003년으로 갈수록 내성균이 증가함을 알 수 있었으며, 다른 quinolones에 대해서도 다양한 MIC값을 보임을 알 수 있었다 (Table 4). 또한 이러한 균들의 plasmid 분리에 의한 transformation 실험 결과로부터 plasmid에 의한 내성의 획득은 없는 것을 알 수 있었다.

Quinolone에 대한 내성의 원인을 분석하기 위하여 quinolone 내성에 관여하는 유전자의 하나인 *gyrA* gene의 염기 서열을 구명하고 변이 정도를 파악하는 분석은 9종의 그람 음성균에서 *gyrA* gene을 비교하여 제작된 degenerate primer로 623 bp의 염기 서열을 결정하고 cassette ligation-mediated PCR로 전체 염기 서열을 결정하여 이미 보고한 바 있다 (Shin et al 2005).

본 연구에서 이를 보다 연장하여 *parC*, *E*, 및 *gyrB*의 유전자도 확립하여 그 변화를 분석 하였다. 먼저 *gyrA* 이외에 *parC*의 QRDR에서 변이가 관찰되었다. 5번째 단계부터 일괄적으로 58-Ser이 Ile로의 변이가 관찰됨으로써 *parC*의 58번 아미노산 역시 내성획득에 관여됨을 알 수 있었고, 이는 *E. coli*의 일부 균에서 보고된 바와 같았다.

GyrB 역시 아미노산의 변이가 관찰되었는데 이는 일부의 다른 균에서만 특징적인 것으로 *E. tarda*에서는 464-Ser이 Trp로의 변이가 되었다. 이는 역시 4번째 단계의 실험균부터 확인되었으며 이러한 변이 또한 quinolone의 내성 획득에 관여함을 알 수 있었다. 실험적인 mutation균 이외의 분리균에서는 확인이 되지 않았지만, *parC*의 58번, *gyrB*의 464번의 아미노산이 더 높은 quinolone의 내성 획득에 관여됨을 이 실험으로 유추할 수 있었다.

제 4절 Tetracycline 내성 유전자 분석을 위한 multiplex PCR의 응용과 양식현장 Tc 내성균의 유전적 특성 분석

1. 총 론

양어장에서 Tetracycline (Tc)계 약물의 무분별한 이용으로 Tc에 대해 내성을 가지는 많은 종류의 내성균이 발생하게 되었다. 특히 Hekton et al. (1995)은 oxytetracycline (OTC), oxolinic acid (OA)등의 약품이 180~230일이 지난 후에도 해양 저질에 잔류함을 확인하여 저질내 높은 내성균의 분포 가능성을 제시 하였지만 우리나라의 경우 아직 체계적인 연구가 미흡한 실정이다. 더구나 세계적으로 해양 환경과 해산어에서의 OTC의 내성 빈도에 관한 연구보다는 (Ervik et al., 1994; Kerry et al., 1994; Schmit et al., 2000), 오히려 담수어에 대한 것이 비교적 자세하게 이루어지고 있는 실정이 (Spanggard et al., 1993; Vaughan et al., 1996). Chopra et al. (2001)은 다양한 종류의 *tet* 유전자 중 담수어 및 해산어에 발생되어 큰 피해를 주고 있는 그람 음성균에는 energy-dependent efflux 내성 기작에 관련된 *tet*(A), (B), (C), (D), (E) 그리고 (G)등이 많이 분포한다고 보고하였다. 그러나 이전의 *tet* gene 검출에 관한 여러 연구에서는 *tet* probes를 제작하여 hybridization으로 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법이 보고되었지만 (Depaola et al., 1988; Marshall et al., 1983; Lee et al., 1993), 이러한 방법은 실험 과정이 복잡하며 시간이 많이 소비된다는 단점이 있었다. 최근 본 연구실에서는 우리나라에서 분리된 *E. tarda* 에서 나타나는 *tet* 유전자 이용과 분포에 대해 연구 결과를 보고하였다 (Jun et al., 2004). 그러나 많은 약제 투여의 가능성이 있는 우리나라 양식장 주변에서 발견되는 다양한 종의 Tc 내성 미생물총에서는 어떠한 *tet* gene이 분포하고 있는지에 대한 분석은 아직 이루어 지지 않았다. 본 연구에서는 다양한 *tet* 유전자에 대한 하나의 공통된 sense primer와 각각의 *tet* gene에 specific primers를 제작한 후 single PCR과 multiplex PCR을 이용하여 그 감도

분석과 실질적인 현장의 내성균 특성을 분석 하고자 하였다. 그 한 단계로서 다양한 *tet*(A), (B), (C), (D), (E) 그리고 (G) 총 6종의 *tet* gene으로부터 각각 유사한 길이만큼의 부분 DNA를 plasmid에 cloning한 후 이를 templates로 사용하여, multiplex PCR의 정확성과 보다 넓은 응용성을 확인하였다. 또한 우리 나라 양식장의 주변 환경 속에 있는 미생물총에서 Tc에 내성을 나타내는 내성균의 비율과 함께, 이미 보고한 primers를 이용하여 이들 내성균이 가지고 있는 내성 유전자 type을 구체적으로 조사하였다.

2. 방 법

가. 실험 균주

전남대학교 수산생명의학과 병원 미생물학 연구실과 부경대학교 미생물학과 미생물 유전학 연구실의 협조로 *Escherichia coli* (*E. coli*) C600 R222, *E. coli* HB101 pPT3, *E. coli* C600 pJA8122, 그리고 *E. coli* HB101 pBR322를 분양받아 실험의 표준 균주로 이용하였으며, *E. tarda* RE1과 *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) HA 균주는 아래에 기술된 방법으로 *tet* gene을 cloning하여 부경대 해양 식량자원 개발 공동 실습관에 유전자의 염기서열에 대한 분석을 의뢰하여, 이전에 보고된 *tet*(A)와 (E) type과 동일한지를 확인한 후 표준균주로 이용하였다.

나. 시료의 채취

해양 환경에서의 내성분포 조사를 위해 2003년 5월 남해안 일대의 해상가두리 양식장 4곳으로부터 양어장 주변의 표층해수, net의 부착물, 바닥 표면으로부터 10cm 밑의 저질을 각각 취한 후 각 samples를 pool로 하여 시료로 사용하였다. 이때 양식장 4곳 중 2곳은 약 10일전 OTC를 질병 예방을 위하여 투여한 바 있고 또 다른 2곳은 최근 2달간 항생제를 사용한 기록이 없었

다. 각 2곳의 양식장에서 체중 50 ± 12 g의 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*) 4마리의 intestine을 각각 취한 후 각 samples를 pool로 하여 시료로 사용하였다.

다. 내성균 분리

해수, 저질, net의 부착물은 0.15M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) 완충용액으로 10배씩 단계 희석한 후 희석액 10ml을 $0.45 \mu\text{m}$ (pore size) membrane filter에 통과시켜, filter에 고정된 세균을 1% NaCl 첨가 TSA배지 (STSA)와 OTC ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)이 첨가된 STSA배지의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 25°C에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. 조피볼락은 해부하여 장을 분리한 후 중장 0.5g을 5ml의 0.15M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 내성 빈도에 관한 조사는 위와 동일한 방법으로 이행되었다.

라. 세균의 동정

OTC $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 첨가된 배지에서 각기 다른 시료로부터 나타난 colony를 무작위로 취하여 다시 순수 분리한 후 colony의 형태적 특성과 Gram 염색, 그리고 TCBS, CC, GSP 3종의 선택 배지에서의 증식여부를 확인 한 후 API 20E kit와 API 20NE kit (BioMerieux sa, France)로 최종 동정하였다.

마. Primer 제작과 cloning

각기 다른 *tet* gene을 target으로 하여 PCR 을 실시 하였을 때 각 *tet* gene template로부터 모두 유사한 크기의 amplicon이 생성될 수 있도록 각 *tet* gene에 특이적인 primers를 MACAW program (Version 2.0.5, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용한 *tet* 유전자 alignment에서 제작하였다. 생성

되는 amplicons의 예상 크기와 primers의 각 *tet* gene에서의 위치는 Table 1에 기술하였다. 각 *tet* gene template로부터 생성된 amplicon은 Prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정제하였으며, 정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 pUC18에 cloning 시켰다. Alkaline lysis (Kado and Liu, 1981) 법을 사용하여 plasmid 분리한 후 TOPO-TA cloning 시 생성되어지는 EcoR I site를 이용하여 절단하여 보았을 때 cloning된 amplicon은 기대한 크기의 DNA fragment임을 확인하였고 (Fig. 1), 본 연구에 사용된 *tet* gene은 특이 primers로써 (Table 1) *tet* gene의 type도 확인하였다.

Table 1. Primers used in this study

Gene	Origin of the prototype <i>tet</i> gene	Oligo name	Primer sequence (5' to 3')	Primer Position (bp)	Product size (bp)
<i>tet</i> (A)	RE1 from <i>E. tarda</i>	TAF	AATTCTGAGCACTGTCGCG	27~45	
		TAR1	ACAGCCCGTCAGGAAATT	534~517	387
		TAR2	AATGCAGAATGCCAAATG	778~760	752
<i>tet</i> (B)	R222 from <i>E. coli</i>	TBF	GACAAAGATCGCATTGGTA	12~30	
		TBR1	TGAAAGCAAACGGCCTAA	318~301	171
		TBR2	CCATCATGCTATTCCATCC	736~718	725
<i>tet</i> (C)	pBR322 from <i>E. coli</i>	TCF	TATCGTCCATTCCGACAGC	102~120	
		TCR1	CGTGCAAGATTCCGAATA	778~761	631
		TCR2	AACGTTTGGTGGCGGGA	820~804	719
<i>tet</i> (D)	pPT3 from <i>E. coli</i>	TDF	ATATCTCCCGGAAGCGGAT	96~114	
		TDR1	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	631~613	484
		TDR2	GACAGTGGCCGGGATCTG	685~667	590
<i>tet</i> (E)	HA from <i>A. hydrophila</i>	TER	CGCACTGTGATGATGGCA	7~24	
		TER1	ATGTGTCCTGGATTCTT	393~377	246
		TER2	AGCAAGTCCTTGAAACAG	795~778	789
<i>tet</i> (G)	pJA8122 from <i>E. coli</i>	TGF	GCTTGTGCCAGCAGAGCAG	96~114	
		TGR1	ATGCCAACACCCCGGCG	950~933	803
		TGR2	CTTGTTACTGCTGACATT	990~973	895

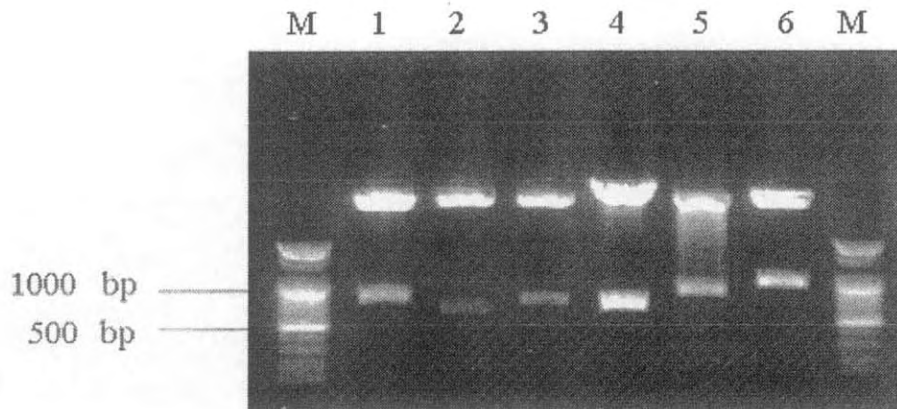


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis the cloned *tet* genes in pUC18 plasmid after EcoR I treatment. Lane 1, *E. tarda* RE1 [*tet*(A)]; lane 2, *E. coli* C600 [*tet*(B)]; lane 3, *E. coli* HB101 pBR322 [*tet*(C)]; lane 4, *E. coli* HB101 pPT3 [*tet*(D)]; lane 5, *A. hydrophila* HA [*tet*(E)]; lane 6, *E. coli* C600 pJA8122 [*tet*(G)]; M, 100bp DNA ladder.

바. PCR과 Multiplex PCR

6종의 *tet* genes을 cloning한 각 plasmid는 *E. coli* HB101에 transformation을 시킨 후 (김, 1993), alkaline lysis법을 사용하여 분리하였고, Tc 내성 isolates의 total nucleic acid 분리는 Chen과 Kuo (1993) 방법에 따랐다. 분리된 각각의 plasmids는 하나의 pool로 혼합하여 각 *tet* gene을 함유한 plasmid의 농도가 0.5 μ g/ml 이 되게 하였다. 준비된 plasmids pool과 total nucleic acid는 일반 PCR 또는 multiplex PCR의 template로 사용하였다. *tet* gene의 확인을 위한 일반PCR과정은 Yoo et al. (2003)의 방법에 따라 시행하였다. Multiplex PCR에서는 6종의 *tet* gene 각각에 specific한 6개의 antisense primers와 6종의 *tet* gene에서 나타나는 하나의 conserved 부위를 이용한 sense primer를 혼합하여 사용하였으며, amplification cycle은 PCR과 동일하게 하였다. PCR 생성물은 0.5 μ g/ml EtBr (ethidium bromide)이 첨가된 1% agarose gel 상에서 0.5 \times TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA)를 이용하여 전기영동을 실시한 후, UV (ultraviolet)하에서 나타나는 band를 관찰하여 증폭 여부를 확인하였다.

사. *tet* gene type의 분포 조사

OTC가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50~100개정도 취하여 TSB에 접종하고 25 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양한 후 total nucleic acid를 분리하여 여러 특이적인 primer를 이용해 일반PCR과 multiplex PCR을 위한 template로 이용하였다. PCR 산물은 0.5 μ g/ml EtBr이 첨가된 1% agarose gel로 TAE buffer에서 전기영동을 실시한 후 *tet* gene의 종류를 확인하였다.

3. 결 과

가. Multiplex PCR의 활용

Host cell 내에서 cloning 된 *tet* 유전자를 함유한 각각의 plasmid가 동일한 copy수를 갖게 해주기 위하여 각 *tet* gene template로부터 모두 유사한 크기의 amplicon이 생성 될 수 있는 primer (TAR2~TGR2) (Table 2)를 이용하여 PCR을 실시하였고 각각의 생성된 amplicon은 puc18에 cloning 하였다 (Fig 1). 제작한 각기 다른 *tet* gene 을 함유한 6종의 plasmid는 transformants 로부터 분리 한 후 pool로 하여 사용 하였다. 그리고 6종의 *tet* gene들이 갖는 conserved region으로부터 제작된 TETF와 각각의 *tet* gene에 특이적인 primers (TAR1, TBR1, TCR1, TDR1, TER1, TGR1)중 하나를 취하여 한 set의 primer를 이용하여 각 *tet* gene에 특이적인 일반 PCR을 실시한 결과, amplicon의 크기가 *tet* gene의 type에 따라 명확히 구별되는, *tet*(A) (387bp), *tet*(B) (171bp), *tet*(C) (631bp), *tet*(D) (489bp), *tet*(E) (246bp) 그리고 *tet*(G) (803bp)인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 분리된 plasmid를 template 로 하여 multi-template에 대한 multi-primer의 실험, 즉 6종의 template와 6종의 primer를 사용하여 최대의 분별력, 즉 6개의 각기 다른 길이를 가지는 amplicon을 얻고자 하였다. 그 결과 가장 유사한 염 homology를 갖는 3개의 template를 혼합한 경우부터 6개 전부의 template를 혼합한 경우까지 모든 경우에서 뚜렷한 특이적 band를 확인할 수 있어 본 multiplex PCR의 정확성과 분별력 그리고 활용성의 가치를 plasmid를 template로 사용하여 보다 명확하게 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

나. 양식장 주변 해양미생물에서의 Tc 내성균 비율분석과 분리균의 동정

양어장 환경에서 채집된 시료를 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는

6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였다. 그리고 수산생물의 분석에서, 먼저 항생제를 투여하지 않은 양식장의 조피볼락에서 나타나는 장내 세균에서의 내성균 빈도는 0.25%였으나 항생제를 투여한 양식장의 조피볼락에서 나타나는 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%로 나타나 항생제의 사용과 어류의 장내 세균에서 나타나는 내성균의 빈도는 밀접한 상관관계가 있음을 보여주었다 (Table 2).

Table 2. Proportion of OTC resistant bacteria in marine aquatic environment of Korea

Samples	% of OTC resistant isolates	Numbers of isolates	%of each <i>tet</i> gene	
			<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (C)
Seawater of farm	6.7	50	80	20
Sediment	24.4	25	96	4
Net	30.7	25	100	0
Intestine of rockfish (a)	2.83	25	100	0
Intestine of rockfish (b)	0.25	50	92	8

* Rockfish (a) : OTC treatment before 1 week of sampling

* Rockfish (b) : no antibiotics treatment before 3 months of sampling

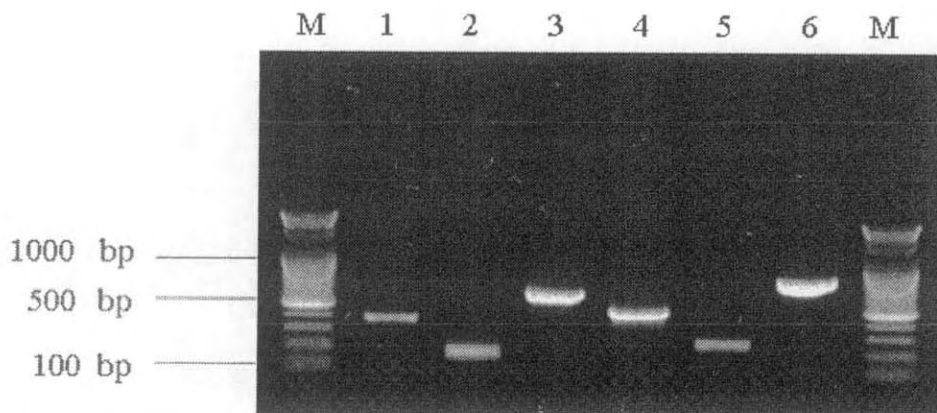


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products from cloned *tet* genes in pUC18 plasmid with a single set of *tet* gene primer. Lane 1, *tet*(A) lane 2, *tet*(B) lane 3, *tet*(C) lane 4, *tet*(D) lane 5, *tet*(E) lane 6, *tet*(G) M, 100bp DNA ladder.

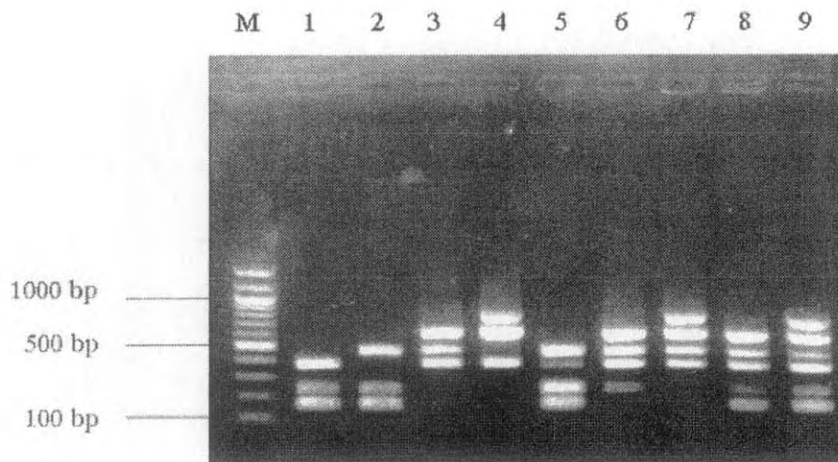


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR with mixed primer sets to mixture of the cloned *tet* genes in pUC18 plasmid. Lane 1, *tet*(B), *tet*(E) and *tet*(A) lane 2, *tet*(B), *tet*(E) and *tet*(D); lane 3, *tet*(A), *tet*(D) and *tet*(C); lane 4, *tet*(A), *tet*(C) and *tet*(G); lane 5, *tet*(B), *tet*(E), *tet*(A) and *tet*(D); lane 6, *tet*(E), *tet*(A), *tet*(D) and *tet*(C); line 7, *tet*(A), *tet*(D), *tet*(C) and *tet*(G); line 8, *tet*(B), *tet*(E), *tet*(A), *tet*(D) and *tet*(C); line 9, *tet*(B), *tet*(E), *tet*(A), *tet*(D), *tet*(C) and *tet*(G); M, 100bp DNA

다. Tc 내성균이 함유한 *tet* gene type의 분포 조사

각기 다른 시료로부터 분리된 내성균으로부터 total nucleic acid를 분리한 후 이를 template로 이용해 multiplex PCR을 실시함으로써 각 시료로부터 나타난 Tc내성균은 어떠한 type의 *tet* gene을 이용하고 있는지를 분석하였다. 흥미롭게도 모든 시료에서 나타난 Tc내성균 대부분은 tetracycline resistant determinant로 *tet*(B)를 이용하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 제한된 *tet* 유전자 이용은 다양한 species의 Tc 내성 해양세균 모두에서 공통적인 것으로 나타났다. 그러므로 양식장 주변의 Tc내성 해양 미생물은 *tet*(B)와 (C), 두 종류의 내성 유전자를 편중되게 이용하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

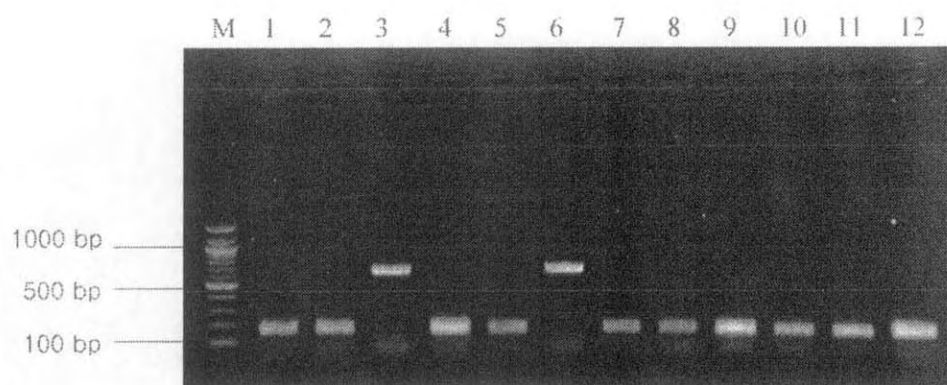


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR from the nucleic acids of oxytetracycline resistance bacterias in marine aquatic environment. Lane 1, 2, *tet(B)*; lane 3, *tet(C)*; lane 4, 5, *tet(B)*; lane 6, *tet(C)*; lane 7~12, *tet(B)*; M, 100bp DNA ladder.

4. 결 론

현재 우리나라에서는 *E. tarda*의 어류 병원성 세균에서의 약제감수성에 관하여서는 몇몇 보고가 되어 있지만 (최와 김, 1994; 최등., 1996), 우리나라 양식장의 주변 환경 속에 있는 다양한 종의 미생물에서 나타나는 Tc 내성균의 분포는 어느 정도인지, 그리고 나아가서는 내성균이 갖는 내성 유전자 type은 여러 종류의 *tet* 유전자 type중에서 어떠한 것인지는 분석되어져 있지 않다.

본 연구에서는 각각의 *tet* 유전자로부터 유사한 크기의 PCR product를 생성할 수 있는 특이적인 primers를 제작한 후 각 *tet* gene의 표준균주로부터 분리한 total nucleic acid를 template로 하여 PCR을 실시하고, 생성된 amplicon을 TOPO TA vector에 cloning시켜 *E. coli* HB101 host cell에 transformation을 실시하여 plasmid를 분리하였다. 이렇게 분리된 plasmid들은 각 *tet* gene에 대하여 동일한 *tet* gene의 copy 수와 동일한 host cell 물질의 영향에 있는 template로서의 역할을 할 수 있게 하였다. 그 결과 *tet*(A), (B), (C), (D), (E), 그리고 (G) 6종의 다른 *tet* gene을 함유하고 있는 plasmids를 혼합한 multi templates를 이용한 multiplex PCR에서는 *tet* gene 6개 모두에 대한 PCR 생성물을 얻어, 전기영동 후 6개의 뚜렷한 band가 하나의 lane에서 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 분명히 본 multiplex PCR은 또 다른 연구 분야에서 보다 광범위한 응용력을 나타낼 수 있을 것으로 보다 다양한 측면에서 그 잠재력을 분석하는 것도 매우 중요한 일일 것이다. 그러나 *tet*(A), (B), (C), (D), (E), 그리고 (G)를 가진 각각의 표준 균주로부터 분리한 total nucleic acid를 혼합하여 하나의 pool로 한 후 multiplex PCR의 template로 이용하였을 때, *tet* gene의 type 또는 chromosome / plasmid 등의 location에 따른 내성 유전자의 copy수 차이 때문인지는 명확하지 않지만 동일한 양의 total nucleic acid를 사용한 각각의 *tet* 유전자에 대해, 증폭된 PCR생성물이 양적 차이를 보여 3개의 templates를 혼합한 경우까지는 정확한 3종류의 PCR생성물을 얻을 수 있었으나 4개의 templates를

혼합한 경우부터는 혼합된 *tet* gene 의 종류에 따라 차이를 보였다 (data not shown). 물론 Depaola et al. (1993)과 Lee et al. (1993)은 하나의 내성균에서 3개 이상의 *tet* gene이 나타난 경우가 없었다고 보고하였으므로, total nucleic acid를 이용하여 한종의 세균이 가지는 *tet* gene type 을 결정하는데 이러한 multiplex PCR을 실시하여도 전혀 문제가 되지 않을 것이다.

양식장 주변의 해양환경에서 채집된 다양한 시료를 분석한 결과, net의 부착물질(30.7%)과 저질 (24.4%)에서 가장 높은 TC 내성균의 분포를 보여 주었으며, 해수에서는 그 빈도가 비교적 낮게 나타났다. 그리고 예측할 수 있었지만 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. Kerry et al. (1995)의 조사에서도 저질에서의 OTC에 대한 내성 비율이 26±8.7%로 나타나 본 실험 결과와 유사함을 확인할 수 있었으며, 해양 환경의 경우 해수에 존재하는 이가 양이온이 항생제와 불활성 복합체를 형성하여 저질 등에 축적된다는 보고와도 일치함을 확인할 수 있었다 (Pusell et al. 1996). 그리고, 저질과 net의 부착물질에서 조사된 내성균의 빈도가 24.4%, 30.7%로 각각 높게 나타났다는 것은 이러한 양식장 주변의 환경이 내성균의 reservoir 역할을 충분히 할 수 있을 것이라 추정되어졌다. 물론 이러한 결과는 환경 속에 있는 세균의 종류에 따라서 차이가 날 수 있으므로 서로 직접적으로 그 비율을 비교하기는 어려울 수도 있다.

이런 측면에서 본 연구에서 분석한 세균의 species를 API20E와 20NE를 사용하여 조사한 결과 그 종류가 *Vibrio* spp. 가 60-70% 이상을 차지하였고 *Enterobacter* sp.와 *Shewanella* sp.가 20-30% 그리고 *A. hydrophila* 가 약 4-20%인 것으로 나타났으나 그 동정의 정확도는 매우 제한적이라고 밖에 할 수 없어 data로서 포함시키지는 않았다 (data not shown). 또한 시료간의 뚜렷한 세균총의 경향의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 이 Tc 내성균들이 이용되고 있는 *tet* gene의 type은 *tet*(B)와 *tet*(C) 두개의 유전자만으로 나타나 상당한 의미를 부여할 수는 있으리라고 추정하고 있다. 그것은 아마

Vibrio spp. 가 *tet(B)* 유전자를 dominant한 type으로 사용되는 것과 연관이 있으리라고 추정 된다 (Kim et al., 2007). 그리고 흥미 있는 것은 해수와 장내세균에서 낮은 비율로 발견 되었지만 *A. hydrophila*균은 모두 *tet(C)*를 이용하고 있는 것을 알 수 있었다. 비록 Andersen et al. (1994)은 해양 저질에서 분리된 내성균 중 그람 음성균에 존재하는 *tet* 유전자를 조사해본 결과, *tet(A)*, (B), (C), (D) 그리고 (E) 등의 다양한 분포를 보였다고 보고하였지만 본 실험에서는 *tet(B)*, (C)만을 확인할 수 있어 차이를 보였는데 그것은 오염 지역의 부두 저질만을 분석한 결과와 양식장 주변의 시료를 대상으로 한 본 연구와의 차이에서 나타난 것이거나 분리된 균의 species가 제한적이었다는 거에서 유래 하였을 수도 있다.

비록 본 연구에서는 Gram 음성균에서 주로 나타나는 6종의 *tet* gene type에 대한 분석만을 실시하였지만 향후에는 보다 다양한 시기에 다양한 양식장 주위 환경으로부터 분리된 해양 세균에 대한 비교분석까지 이루어져야 할 것이며, 나아가서는 32종 이상으로 알려져 있는 다양한 *tet* gene type 모두에 대한 분석이 이루어져 한 종의 해양 세균에 나타날 수 있는 여러 type의 *tet* gene까지도 분석되어야 할 것이다. 결론적으로 본 part의 연구에서는 각각의 6종 *tet* gene을 유사한 크기의 DNA로 cloning한 후 plasmids를 이용하여 multiplex PCR을 실시하여 6개의 template를 혼합한 경우까지 모든 경우에서 뚜렷한 특이적 band를 확인할 수 있어 본 방법의 정확성과 분별력 그리고 활용성의 가치를 보다 명확하게 확인할 수 있었다. 확립된 본 기법을 이용하여 양어장 환경에서 채집된 세균총을 분석한 결과, 양식장 주변 해수에서는 6.7%, 저질에서는 24.4% 그리고 net의 부착물질에서는 30.7%의 내성균 빈도를 보였으며, 항생제를 투여한 조피볼락의 장내 세균에서의 내성균 빈도는 2.83%, 항생제를 투여하지 않은 조피볼락은 0.25%의 내성균 빈도를 보여 항생제를 투여한 어류가 항생제를 투여하지 않은 어류에 비하여 높게 나타났다. 분리된 내성균에는 *tet(B)*, *tet(C)*만을 확인할 수 있어 대부분이 두 종류의 내성 유전자에 편중되게 나타남을 알 수 있었다.

제 5 절 *Vibrio* spp.에서의 *tet* 유전자 분석을 통한 Tc 내성 유전자의 발현 특성

1. 총 론

테트라사이클린 내성 균주들의 내성 유전자에 대한 연구가 있었으나 세균의 종에 따라 미흡한 면이 많은 실정이며, *tet* gene을 검출하는 기법은 *tet* probes를 제작하여 DNA-DNA hybridization을 통하여 내성 유전자의 종류를 확인하는 방법으로서, 실험과정이 어렵고 시간이 많이 소비되는 단점이 있었다 (DePaola *et al.*, 1988 ; Marshall *et al.*, 1983 ; Lee *et al.*, 1993). 해양 환경에서 어류 질병을 일으키는 세균에는 *Vibrio* spp., *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas hydrophilla*를 포함한 많은 종류의 세균들이 있으며, 앞으로 *tet* gene과 같은 내성 유전자들을 지닌 어병 세균에 의해 항생제를 많이 사용하는 양식 현장에서 피해를 입을 것으로 예상된다. 이에, 본 연구에서는 다양한 양식 환경으로부터 tetracycline에 대하여 내성을 지니고 있는 균주들을 분리 한 후 대표적인 어병 세균인 *Vibrio*균과 정상어의 장내세균들이 어떠한 *tet* gene을 지니고 있는지 확인해보고자 하였다. 그리고 *Vibrio*균에서 분리한 tetracycline 내성 유전자의 분자적인 특성을 분석하였다.

2. 방 법

가. 실험 균주

1993년부터 2003년에 이르는 기간 동안, 병어, 해수 및 정상어의 장내 세균총 으로부터, tetracycline 내성 세균을 분리할 수 있었으며, 각각 제주, 통영, 거제, 포항, 부산 등 동해안 및 남해안에 위치하는 어류 양식장으로부터

분리·배양되었다. 분리균은 TSB 혹은 TSA 배지상에서 증식되었고, 선택배지인 TCBS와 Chromocult coliform agar (CC agar)를 사용하여 동정하였다. 분리된 *Vibrio* spp. 와 장내 세균 중에서 Tc에 대해 저항성을 나타내는 것은, tetracycline이 10 μ g/ml 첨가된 MH agar를 이용하여 선별되었으며, 각 균주의 세부 동정은 API 20E system에 균을 접종한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 24~48시간 배양함에 따른 kit의 색 변화를 통하여 이루어졌다. Tc에 대한 내성 기준은 MIC로 나타내었으며, breakpoint 16 μ g/ml 이상 (NCCLS, 1993)으로 하였다. MIC 결과, 113개의 *Vibrio* spp. 중에서 Tc에 대해 16 μ g/ml의 값을 나타내는 32개의 Tc 내성 *Vibrio* spp.를 분리할 수 있었다 (Table 1).

Table 1. Tetracycline resistant *Vibrio* spp. isolated in Korea

Strains	Source	Area	Year
<i>Vibrio</i> sp. JE1	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV2	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV4	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp.. RV5	sea bass	Hadong	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV11	flounder	Namhae	1993
<i>Vibrio</i> sp. RV16	flounder	Pohang	1993
<i>Vibrio</i> sp. YV1	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV4	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. YV5	flounder	Yeosu	1994
<i>Vibrio</i> sp. JV12	sea perch	Pohang	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV13	flounder	Namhae	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV14	mullet	Yeosu	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV15	sea perch	Yeosu	2001
<i>Vibrio</i> sp. JV17	sea water	Jeju	2002
<i>Vibrio</i> sp. JV18	flounder	Jeju	2002
<i>Vibrio</i> sp. M1	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M2	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M3	sea water	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M4	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. M5	flounder	Tongyeong	2002
<i>Vibrio</i> sp. GV2	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV3	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV4	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. GV5	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT1	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT2	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT3	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT4	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT5	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT6	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT7	sea perch	Geoje	2003
<i>Vibrio</i> sp. KT8	sea perch	Geoje	2003

나. PCR과 Primer 제작

본 연구에서 사용된 primer sets는, *tet* gene 중 efflux 기능을 수행하는 것과 ribosomal protection 기능을 수행하는 것을 검출하기 위하여, 각각의 염기 서열로부터 특이적으로 제작되어 사용되었다. 먼저, efflux *tet* gene을 검출하기 위한 multiplex PCR용 primer sets는 이전의 연구에서 *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)를 검출하기 위해 제작된 1개의 forward primer와 각 *tet* gene에 따른 여섯 개의 reverse primers를 사용하였다 (전, 2004). 그리고, 마찬가지로 efflux *tet* gene인 *tet*(K)와 *tet*(L)의 존재 유무를 확인하기 위해서, Genbank (NCBI)로부터, 여러 종류의 세균에 존재하는 *tet*(K) 및 *tet*(L)의 염기 서열을 얻은 후, MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, ND, USA)을 이용하여 비교하여 서로 다른 *tet* gene에 결합할 수 없도록 sense primer와 antisense primer를 제작하였다. 마찬가지로, 가장 대표적인 ribosomal protection gene인 *tet*(M)에 대해서도 특이적으로 결합할 수 있는 primer set을 제작하였다. 본 실험에서 사용된 *tet* gene을 검출하기 위해 사용된 primers의 염기 서열과 예상되는 증폭 산물의 크기를 다음의 table 2에 나타내었다.

Multiplex PCR은 시간적, 경제적인 절약을 위해 각각의 *tet* gene에 대해 특이적으로 반응하는 sense primer들과 antisense primer들을 한꺼번에 넣고 실시하였다 (전, 2004).

다. *tet*(M)의 분자적 구조 분석을 위한 PCR

검출된 *tet*(M)의 분자적 구조와 그 기원을 밝히기 위하여, Genbank (NCBI)에서 여러 세균에 존재하는 *tet*(M)의 염기 서열을 MACAW program을 이용하여 비교하였다. *tet*(M)은 크게 conjugative transposon인 Tn916에서 기원한 것과 Tn1545에서 기원한 것으로 나눌 수 있는데, 우리나라의 *tet*(M)

은 어떤 transposon으로부터 유래하였는지를 알기 위하여, 각각의 conserved region으로부터 제작된 forward primer인 TMF와, variable region으로부터 제작된 reverse primers인 TMRV1, V4를 이용하여, 세 개의 primers를 동시에 넣고 행해진 multiplex PCR로 어떤 유형의 *tet(M)*인지를 알아보하고자 하였다. primer들의 sequence는 다음과 같다 (Table 3).

Table 2. Primers and expected sizes of PCR amplicons for various *tet* genes

Primer	<i>tet</i> genes	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes	Accession No.
TETF	<i>tet(A)</i> to <i>tet(G)</i>	GCGCTNTATGCGTTGATGCA		
TAR	<i>tet(A)</i>	ACAGCCCGTCAGGAAATT	387bp	X0006
TBR	<i>tet(B)</i>	TGAAAGCAAACGGCCTAA	171bp	J01830
TCR	<i>tet(C)</i>	CGTGCAAGATTCCGAATA	631bp	J01749
TDR	<i>tet(D)</i>	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	489bp	X65876
TER	<i>tet(E)</i>	ATGTGTCCTGGATTCCCT	246bp	L06940
TGR	<i>tet(G)</i>	ATGCCAACACCCCGGCG	803bp	S52437
TKF	<i>tet(K)</i>	GTAATGGTACCTGGTAAATC	399bp	S74032
TKR		CTATTACCTATTGTCGCTAC		
TLF	<i>tet(L)</i>	GATCGATAGTAGCCATGG	480bp	U17153
TLR		CTTCTATCAACAAGTATC		
TMF	<i>tet(M)</i>	GAATCTGAACAATGGGAT	1099bp	U09422
TMR		CTAACAATTCTGTTCCAGC		

Table 3. Primers and expected sizes of amplicons in PCR to determine the type of *tet*(M)

Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Expected sizes	Origin	Position* (bp)
TMF	GAATCTGAACAATGGGAT			
TMRV1	CGTTTGCAGCAGAGGGAGG	534bp	<i>Tn</i> 1545	1044~1036
TMRV4	CATTCCACTTCCCAACGG	964bp	<i>Tn</i> 916	1476~1461

* Based on the sequence of *Tn*916(accession no. X90939) and *Tn*1545(accession no.X92947).

라. *Vibrio* spp.에서 분리한 *tet(B)*와 *tet(M)*의 상대적 위치 확인

*tet(B)*와 *tet(M)*의 상대적인 거리 분석을 위하여, *tet(B)*와 *tet(M)*으로부터 각각 5' end 방향으로 향하는 reverse primer인 BRS1과 MRS1, 그리고 3' end 방향으로 향하는 forward primer인 BFS1과 MFS1을 제작하여, band가 나올 수 있는 가능성이 있는 경우의 수만큼 primer를 조합하여 PCR함으로써 두 gene사이의 위치적 관계를 파악하고자 하였다. primer의 상대적인 위치와 염기서열은 다음과 같다 (Table 4).

Table 4. Primers used in PCR to confirm the location of *tet(B)* and *tet(M)*

Primer	Direction	Oligonucleotide sequence (5 → 3)	Position (bp)	Expected size
BFS1	sense in <i>tet(B)</i>	CCTTACCAATGCAACCGGTG	1019~1039	
BRS1	antisense in <i>tet(B)</i>	TGAAAGCAAACGGCCTAA	161~142	
MFS1	sense in <i>tet(M)</i>	GTGGAGAAATCCCTGCTC	1825~1843	unknown
MRS1	antisense in <i>tet(M)</i>	GTAATTCCTCTCTGACG	164~148	

3. 결 과

가. Multiplex PCR 기법을 통한 efflux *tet* gene의 검출

총 32개의 *Vibrio* spp.와 16개의 장내 세균 및 기타 세균의 total nucleic acid를 사용하여 tetracycline 내성 유전자의 유무와 그 종류에 대하여 조사하였다. 먼저 *tet* gene 중 efflux 기능을 수행하는 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*에 대한 실험으로, 이전의 연구에 따른 efflux gene의 multiplex PCR 기법을 이용하였다 (전, 2004). 먼저, 실험에 사용한 sense primer는, 여섯 개의 *tet* gene의 150bp 부위의 conserved region에서 제작되었고, 각 gene 별로 300~1000bp부위의 variable region을 특이적으로 제작하여 antisense primer로 사용하였다. 이렇게 제작된 primer들을 이용하여 multiplex PCR을 실시하였을 때, 각 내성 유전자들에 대해 특이적 PCR 산물을 얻는 것이 가능하였다.

실험 결과, *Edwardsiella tarda*에서는 *tet(A)*, *tet(B)*, 그리고 *tet(D)* 등이, *Aeromonas hydrophila*에서는 *tet(C)*가 검출되었으며, *Morganella morganii*에서는 *tet(D)*, *Enterobacter cloacae*와 *Shewanella* sp.에서는 *tet(B)*가 검출되는 등, 장내 세균 및 기타 세균에서는 세균 종에 따라 다양한 efflux *tet* gene이 존재함을 알 수 있었다. 반면, 모든 *Vibrio* spp.에서는 PCR 결과 대략 200bp에 근접하는 band만을 확인할 수 있었는데, 즉 여섯 개의 efflux *tet* gene 중에서 *tet(B)*가 압도적으로 많이 존재하였다. Fig. 1은 총 48개의 균주 중에서, 장내 세균 중 8개의 균주와, *Vibrio* spp.중에 6개의 균을 무작위로 선택하여 multiplex PCR한 결과이다. lane 1~6에서는, 각각 *tet(A)* (387bp), *tet(D)* (489bp), *tet(C)* (631bp) 그리고 *tet(B)* (171bp)의 band들을 확인할 수 있었으며, lane 9~14에서는 *tet(B)* (171bp)의 band가 모두 나타났다. Lane 7과 8의 *Streptococcus* sp. 균주에서는 Tc 내성은 존재하였지만, 여섯 개의 efflux gene 중 어느 것도 검출되지 않았으며, 각각의 *tet* gene에 대하여 multiplex PCR 하지 않고 단독으로 PCR 했을 때에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

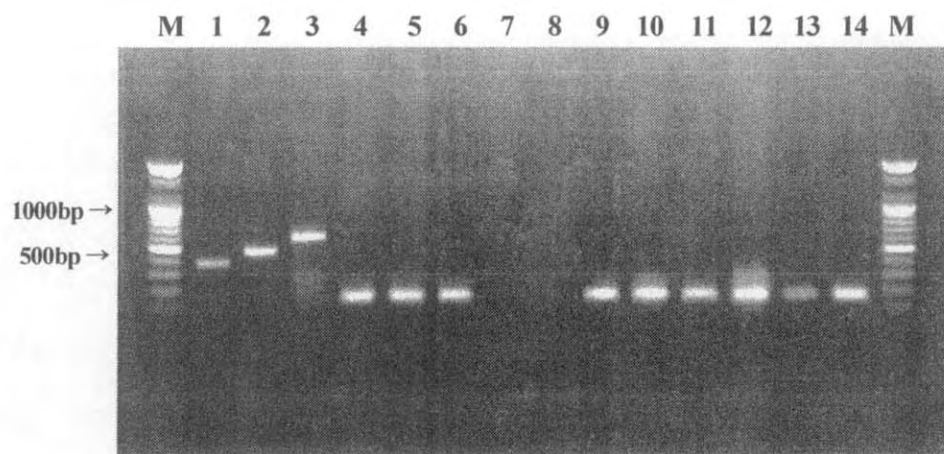


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR for efflux *tet* genes. lane1, *E. tarda* R1 ; lane2, *E. tarda* E31 ; lane3, *A. hydrophila* A1 ; lane4, *Enterobacter cloacae* E1 ; lane5, *E. tarda* E32 ; lane6, *Shewanella* sp. S1 ; lane7, *Streptococcus* sp. M14-1 ; lane8, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane9, *Vibrio* spp. RV16 ; lane10, *Vibrio* spp. RV2 ; lane11, *Vibrio* spp. JV17 ; lane12, *Vibrio* spp. JV13 ; lane13, *Vibrio* spp. YV1 ; lane14, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

나. *Vibrio* spp. 내의 *tet(B)*와 *tet(M)*의 확증

한국에서 채집된 모든 *Vibrio* spp.에서는 *tet(B)*와 *tet(M)*이 함께 존재함을 한번의 PCR로 확인해보기 위해, *tet(B)*를 검출하도록 디자인된 TETF-TBR1 (5'-CTTCTATCA -ACAAGTATC-3') set와, *tet(M)*을 검출하기 위한 TMF-TMR primer들을 이용하였다. Primer들의 각 *tet* gene에 대한 특이성을 확인해 보기 위해, *tet(B)*만 (lane 1~3) 혹은 *tet(M)*만 (lane 4)이 검출되었던 균주들과 함께 PCR해서 *Vibrio* spp. (lane 5~10)의 PCR 결과와 비교해 보았다.

PCR의 결과가 Fig. 2에 나타나 있다. lane 1~3에서는 TETF와 TBR1이 595bp의 *tet(B)*를, lane 4에서는 TMF와 TMR이 1099bp의 *tet(M)*을 만들어냄을 확인할 수 있었고, lane 5~10에서는 *tet(B)*와 *tet(M)*의 band가 동시에 나타남으로써, *Vibrio* spp.에 두 gene이 존재함을 특이적으로 확인할 수 있었다.

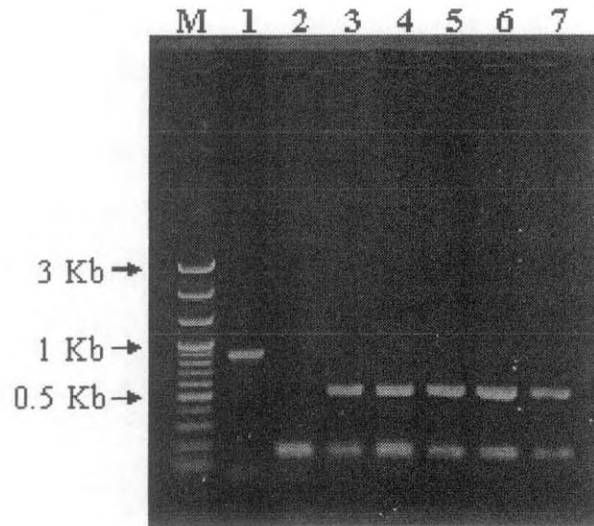


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by multiplex PCR for the detection of *tet(B)* and the discrimination of *tet(M)*. Lane M, 100-bp DNA ladder lane 1, *Streptococcus* sp. CJ23 (*tet(M)*, 1,099 bp); lane 2, *Vibrio* spp. C35 (*tet(B)*, 171 bp); lane 3, *Vibrio* spp. RV16; lane 4, *Vibrio* spp. RV5; lane 5, *Vibrio* spp. JE1 lane 6, *Vibrio* spp. M4 lane 7, *Vibrio* spp. YV1 (*tet(B)*, 171 bp).

다. *tet(M)*의 분자적 구조 분석

1) *tet(M)*의 염기 서열 분석

PCR 결과로 *tet(M)*의 존재가 확인된 *Streptococcus* sp. CJV23과 *Vibrio* spp.의 total nucleic acids를 주형으로 하여, *tet(M)*을 특이적으로 검출할 수 있도록 디자인된 TMF-TMR primer set으로 PCR을 실시하고, 증폭 산물을 정제하여 TOPO-TA vector에 cloning시킨 후, 염기서열을 분석하였다. 보고된 바에 의하면, *tet(M)*은 conjugative transposon인 Tn916 혹은 Tn1545에 위치하므로 (Barbeyrac 등, 1996), Genbank (NCBI)로부터 Tn916상에 존재하는 *tet(M)*과 Tn1545상에 존재하는 *tet(M)*의 염기서열을 찾고, MACAW program을 이용하여 *Streptococcus* sp. CJV23 및 *Vibrio* spp. 중 하나인 *Vibrio damsela* RV16의 *tet(M)*의 전체 염기서열과 비교하였다.

*tet(M)*의 structural gene 내에서의 비교 결과, Tn916의 *tet(M)*과 Tn1545의 *tet(M)* 사이에는 94.8%의 상동성을 나타내었다. *Streptococcus* sp. CJV23의 *tet(M)*은 Tn916의 *tet(M)*과, *Vibrio damsela* RV16의 *tet(M)*은 Tn1545의 *tet(M)*과 상대적으로 더 흡사하였으며, 상동성은 각각 99.3%와 99.7%이었다. 그리고, RV16과 CJV23을 비교하였을 때는, 94.4% 일치하였다.

2) *tet(M)*의 type 구별

염기서열의 분석을 통하여, 한국에서 분리된 *tet(M)*이 Tn916과 Tn1545 중 어떤 transposon에서 기원한 *tet(M)*인지를 추측해 볼 수 있었다. 그러나, 해양 환경 중에 존재하는 수많은 세균들에 존재하는 *tet(M)*을 모두 염기서열 분석하기에는 시간적·경제적인 어려움이 있으므로, 한번의 PCR로써 두 type의 *tet(M)*을 구별해보고자 하였다.

이를 위해, 두 가지 type의 *tet(M)*의 conserved region에서 forward primer인 TMF를 제작하고, variable region에서 reverse primer인 TMRV1,

TMRV4를 각각 증폭산물의 크기가 534bp, 964bp로 다르게 산출되도록 제작하여 (Fig. 3), 세 개의 primer를 한꺼번에 넣고 PCR을 실시하였다. PCR 결과, lane 1의 *Streptococcus* sp. CJV23은 TMRV4와 반응하여 964bp의 band가, *Vibrio* spp.들은 TMRV1과 반응하여 534bp의 band가 만들어졌다. 이는 염기서열 분석 결과와 동일하였으며, 한번의 PCR로써 어떤 transposon으로부터 유래한 것인지, *tet(M)*의 기원을 추측하는 것이 가능하였다 (Fig. 4).

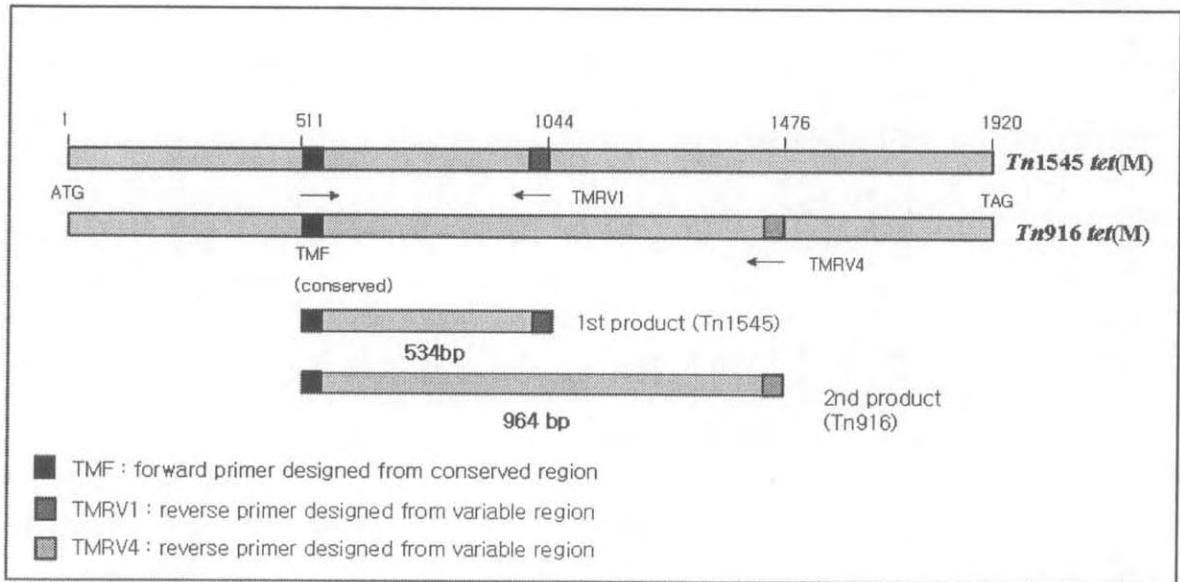


Fig. 3. Schematic illustration of the primer position for multiplex PCR. One pair of primers (TMF and TMRV1) yield a 534bp segment after PCR amplification. The other pair of primers (TMF and TMRV4) yield a 964bp amplicon.

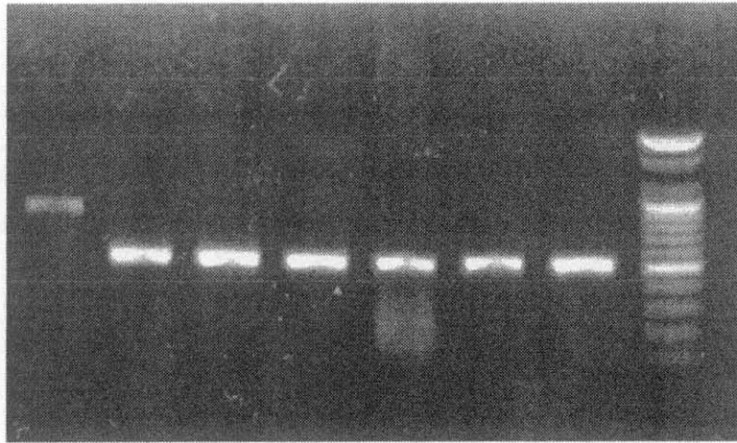


Fig. 4. Amplicons of different size in multiplex PCR to determine the type of *tet(M)*. lane1, *Streptococcus* sp. CJV23 ; lane2, *Vibrio* spp. RV16 ; lane3, *Vibrio* spp. RV2 ; lane4, *Vibrio* spp. JV17 ; lane5, *Vibrio* spp. JV13 ; lane6, *Vibrio* spp. YV1 ; lane7, *Vibrio* spp. JE1 ; M, 100bp DNA ladder.

3) *tet(B)*와 *tet(M)* 사이의 염기 서열 분석

대략 2.9kb의 PCR 생성물을 정제하고, cloning하여 염기 서열을 분석하고 genbank (NCBI)의 염기서열과 비교하였다. 분석 결과, *tet(B)*와 *tet(M)*의 거리는 2,536bp였다. *Vibrio spp.*의 *tet(B)*의 뒷부분은, Tn10의 *tet(B)*의 뒷부분과 100% 일치하였다. Tn10에는 insertion sequence인 IS10이 transposon의 right end와 left end에 서로 inverted repeating되어서 존재하며, transposon의 다른 균 내로의 insertion에 관련된 기능을 수반한다. 염기 서열 분석으로, *Vibrio spp.*의 *tet(B)*와 *tet(M)* 사이에 IS10-right가 있음이 확인되었다. IS10 뒷부분으로, 14bp의 거리를 두고, *tet(M)*의 leader peptide와 *tet(M)*이 동일 DNA 선상에 존재하였다 (Fig. 5, 6).

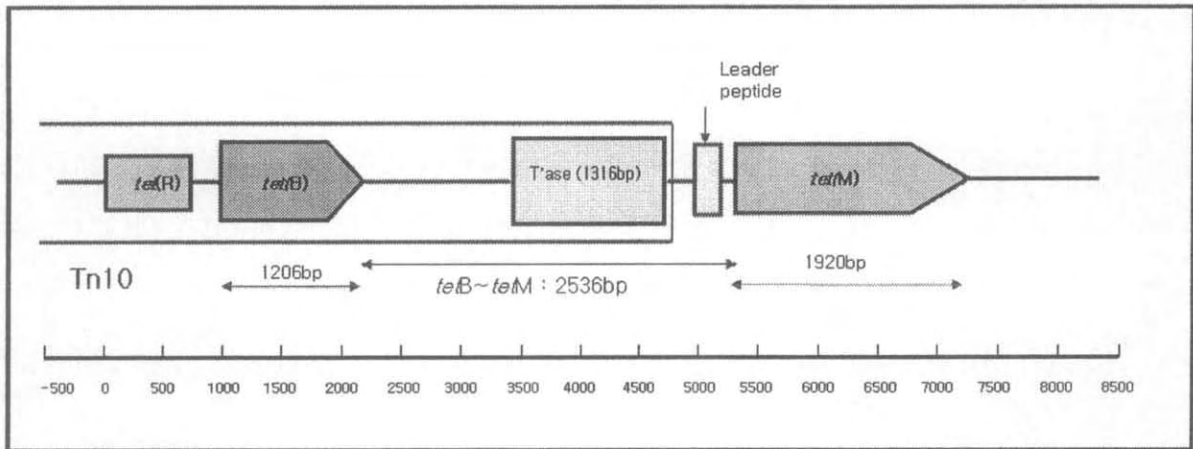


Fig. 5. Schematic illustration of the relative location between *tet(B)* and *tet(M)*.

GCACCTTATGCGTTAATGCAGGTTATCTTTGCTCCTTGGCTTGGAAAAATGTCTGACCGATTGGTCGGCGCCAGTGCTGTTGTTGCATTAATAGGCG 100
CATCGCTGGATTACTTATTGCTGGCTTTTCAAGTGCCTTTGGATGCTGTATTAGGCCGTTGCTTTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGCTGTCGC 200
GGCATCGGTCATTGCCGATACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTGGTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTTGGTTAATAGCGGGGCTATT 300
ATTGGTGGTTTTGCAGGAGAGATTCACCCGATAGTCCCTTTTTATCGCTGCGTGTGCTAAATATTGTCACCTTCCCTGTGGTTATGTTTTGGTTCCGTCG 400
AAACCAAAAATACACGTGATAATACAGATACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAATTCGGTATACATCACTTTATTTAAAACGATGCCATTTTGT 500
GATTATTTATTTTCAGCGCAATTGATAGGCCAAATCCCGCAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAATCGTTTTGGATGGAATAGCATGATGGTTGGC 600
TTTTCATAGCGGGTCTTGGTCTTTTACACTCAGTATCCAAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAATAGCCACTAAATGGGGCGAAAAACGGCAGTACTGCTCG 700
AATTTATTGCAGATAGTAGTCATTTGCCCTTTTAGCGTTTATATCTGAAGGTTGGTTAGATTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGGATCGC 800
TTTACCTGCATTACAGGAGTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATGAGCAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGCCTTACCAATGCAACCGGTGTT 900
ATTGGCCCACTACTGTTTACTGTTATTTATAATCACTACTACCAATTTGGGATGGCTGGATTTGGATTATTGGTTAGCGTTTTACTGTATTATTATCC 1000
TGCTATCGATGACCTTCATGTTAACCCCTCAAGCTCAGGGGAGTAAACAGGAGACAAGTGTAGTTATTTTCGTCACCAATGATGTTATTCCGCGAAAT 1100
ATAATGACCCCTTGATAACCCAAGAGGGCATTTTTACGATAAAGAAGTTAGCTCAAAATAAACCTATCTATTTTATTTATCTTTCAAGCTCAATA 1200
AAAAGCCGCGGTAATAGCAATAAATTTGGCCTTTTTATCGGCAAGCTCTTTTAGGGTTTTTCGCATGTATTGCGATATGCATAAACACAGCCATTGAGTAA 1300
GTTTTTAAGCACATCATCATATAAGCTTTAAGTTGGTCTCTTGGATCAATTTGCTGACAATGGCGTTTACCTTACCAGTAATGTATTCAAGGCTAATT 1400
TTTTCAAGTTCATCCAAACCAATGATAGGCATCACTTCTGGATAGGGATAAGGTTTTTATTATTATCAATAATATAAACAAGATAATGTTCAAAATATA 1500
TTTCTAAGGCAGACCAACCATTTGTTAAATCAGTTTTTGTGTGATGTAGGCATCAATCATAATTAATTGCTGCTTATAACAGGCAGTGAATATTGTTT 1600
TTTATTTTAAAGTGATGATAAAGGCACCTTTGGTCACCAACGCTTTCCCGAGATCTCATCTATTGAAACAGCTTGATAGCCTTTTTCAACAAACAAT 1700
ATTCGTGCTGAGTTAACCAAGTGATGATAGGTACTCTAAAAATTTCTTGTGATGATTTTTATTTTCCATGATAGATTTAAATAACATACCGTCAGTA 1800
TGTTTTATGGTATCATGATGATGTGGTTCGACCAATCTAAGAACATTTAGGTTATTTTATGTATATTGAACAGCATTCTCGCTATCAAAAATAAGCTAAT 1900
AACATCCAATTAAGATATGATGATAAGCAGTTTCATAACAACGGTATCAAAGATGTTCTATTATGGATTGAACATAATTTAGATCAGTCTTTACTGCTTG 2000
ATGATGTGGCGAATAAAGCGGGTTATACCAAGTGGTATTTTCAGCGGCTGTTCAAAAAGTAACAGGGGTCACACTGGCTAGCTATATTGCTGCTCGTCG 2100
TTTGACGAAAGCGGCTGTTGAGTTGAGGTTGACGAAAAAACTATCCTTGAGATCGCATTAAATATCAATTTGATTCCCAACAATCTTTTACACGTCGA 2200
TTAAGTACATTTTTAAGGTTACACCAAGTATTATCGGCGGAATAAATATGCGGAATTGGAGGCAATGCAGTGAAGATCCCTCATAATTTCCCAAAA 2300
GCGTAACCATGTGTGAATAAATTTGAGCTAGTAGGGTTGCAGCCACGAGTAAGTCTCCCTTGGTATTGTGTAGCCAGAATGCCGCAAACTTCCATGC 2400
CTAAGCGAAGTGTGAGAGTACGTTTCGATTTCTGACTGTGTAGCCTGGAAGTGTGTGCCAACCTGTTTCTGAGCATGAACGCCCGTAAGCCAACA 2500
TGTTAGTTGAAGCATCAGGCGATTAGCAGCATGATATCAAACGCTCTGAGCTGCTCGTTCGGCTATGGCGTAGGCCTAGTCCGTAGGCAGGACTTTTC 2600
AAGTCTCGGAAGGTTTCTTCAATCTGCATTGCTTCGAATAGATATTAACAAGTTGTTGGGTGTTGCAATTTCAACAGGTAAGTTAGTTGCTAGAACCC 2700
ATGGCTCCTTTGCCGACGCTGAGTAGATTTAGGTGACGGGTGGTGAATGAGTCCGCTGCGAGCGCTGATTTTTTCGGCTTTAGAGCGGAGATTTATA 2800
CAATAGAATTTGGCATGAGATTGGATTGCTTTTAGTCAGCCTCTTATAGCCTAAAGTCTTTGAGTGAATGAGTACATATCATGTAAGTTGCTGATAGGT 2900
TTCCAGTTTTCCGCTCCTAGTCTGCATATTGACTTTTCCCTTACTCGACTTAACAGTACCAACCCAGCTTCTCAACGGATTTATACCATGGCAGT 3000
TAAAGCCAGCATCACTGACAATGAGCGGTGTGGTGTACTCGGTAGAATGCTCGCAAGGTCGGCTAGAAATGGTATGAGCTTTCTTTGAACATTGCTC 3100
TGAAAGCGGGAACGCTTCTCATAAAGAGTAACAGAACGACCGTGTAGTGCAGTGAAGCTCGCAATACCATAAGTCGTTTTTGTCCACGAATATCAGAC 3200
CAGTCAACAAGTACAAATGGGCATCGTATTGCCCGAACAGATAAAGCTAGCATGCCAACGGTATACAGCGAGTCGCTTTTGTGGAGGTGACGATTACCTA 3300
ACAATCGGTCGATTGTTGATGTTATGTTTTGTTCTCGCTTTGGTTGGCAGGTTACGGCCAAGTTCGGTAAGAGTGAGAGTTTTACAGTCAAGTAATGC 3400
GTGGCAAGCCAACGTTAAGCTGTTGAGTCGTTTTAAGTGAATTCGGGGCAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAATAATCGAGTTCGCACATCTTGTGT 3500
CTGATTATTGATTTTTTCGGAAACCATTTGATCGTATGACAAGATGTGATCCACCTTAACCTAATGATTTTTACCAATCATTAGGGGATTCATCAGTG 3600
CTTTGTATGCTTTGTATGCTTTGTATGCCTATGGTTATGCATAAAAAATCCCAAGTATAAGAGTATTATCACTGGGATTTTTATGCCCTTTTGGGCTTTT 3700
GAATGGAGGAAAAATCAGATGAAAAATTAATATTGGAGTTTTAGCTCATGTTGATGCGGGAAAAACTACCTTAACAGAAAGCTTATTATATAACAGTGG 3800
AGCGATTACAGAATTAGGAAGCGTGGCAGAGGTACAACGAAAAACGGATAATACGCTTTTGAACGTCAGAGAGGAATACAATTCAGACGGCGATAACC 3900
TCTTTTCAGTGGAAAAATACTAAGATAAACATCATAGACACGCCAGGACATATGGATTTTTTAGCAGAAGTATATCGTTCATTATCAGTATTAGATGGGG 4000

Fig. 6. Full nucleotide sequence of between *tet(B)* and *tet(M)*.

CAATTCTACTGATTTCTGCAAAAGATGGCGTACAAGCACAAACTCGTATATTGTTTCATGCACTTAGGAAAATAGGTATCCACAAATCTTTTTATCAA 4100
 TAAGATTGACCAAAATGGAATTGATTTATCAACGGTTTATCAGGATATTAAGAGAACTTTCTGCGGAAATTGTAATCAAACAGAAGGTAGAACTGCAT 4200
 CCTAATATGCGTGAATGAACCTTACCGAATCTGAACAATGGGATATGGTAATAGAAGGAAATGATTACCTTTTGGAGAAAATACGCTCTGGGAAATTAT 4300
 TGGAAAGCATTAGAACTCGAACAGAGGAAAGCATAAGATTTTATAATTGTTCCCTGTTCCCTGTTTATCACGGAAAGTCAAAAAACAATATAGGGATTGA 4400
 TAACCTTATAGAAGTGATTACGAATAAAATTTTATTCATCAACACATCGAGGTCAGTCTGAACCTTTGCGGAAAAGTTTTCAAAATTGAGTATCGGAAAAA 4500
 AGACAGCGCTTTCATATATACGTCCTTTATAGTGGCGTACTGCATTTGCGAGATTGCGTTAGAATATCGGAAAAGGAAAAATAAAAAATTACAGAAATGT 4600
 ATACTCAATAAATGGTGAATTATGTAATAATCGATAAGGCTTATCCGCGGAAATGTTATTTTGCAGAATGAGTTTTGAAGTTAAATAGTGTCTTGG 4700
 AGATACAAAGCTATTGCCACAGAGAGAGAATTGAAAATCCCTCCCTCTGCTGCAACCGCTGTTGAACCGAGCAACCTCAACAAAGGAAATGTTA 4800
 CTTGATGCACTTTTAGAAATCTCCGACAGTGACCCGCTTCTGCGATATTATGTGGATTCTGCGACACATGAAATCATACTTTCTTTCTTAGGGAAAAGTAC 4900
 AAATGGAAGTGACTTGTGCTCTGCTGCAAGAAAAGTATCATGTGGAGATAGAAATAAAGAGCGCTACAGTCATTTATATGGAAGACCGTTAAAAAAGC 5000
 AGAGTATACCAATTCACATCGAAGTTCACCGAATCCTTTCTGGGCTTCATTGGTCTATCTGTAGCACCCGCTCCATTAGGGAGCGGAGTACAGTATGAG 5100
 AGCTCGGTTTCTCTTGGATACTTAATCAATCGTTTCAAAATGCAGTTATGGAGGGGATACGCTATGGCTGTGAACAAGGATTGTATGGTTGGAATGTGA 5200
 CGGACTGTAAAATCTGTTTTAAGTATGGCTTATACTATAGCCCTGTTAGTACCCAGCAGATTTTCGGATGCTTGCTCCTATTGTATTGGAACAAGTCTT 5300
 AAAAAAGCTGGAACAGAATTGTTAGAGCCATATCTTAGTTTTAAAATTTATGCGCCACAGGAATATCTTTCACGAGCATACAACGATGCTCCTAAATAT 5400
 TGTGCGAACATCGTAGACACTCAATTGAAAAATAATGAGGTCAATCTTAGTGGAGAAATCCCTGCTCGGTGATTCAAGAATATCGTAGTGATTTAATT 5500
 CCTTTACAAATGGACGTAGTGTTTGTAAACAGAGTTAAAAGGGTACCATGTTACTACCGGTGAACCTGTTTCCAGCCCGTCCGTTCCAAATAGTCGGAT 5600
 AGATAAAGTACGATATATGTTCAATAAAATAACTTAGTGATTTTATGTTGTTATATAAATATGGTTTCTTGTAAATAAGATGAAATATTTTTAATAA 5700
 AGATTTGAATTAAGTGTAAGGAGGAGATAGTTATTATAAACTACAAGTGGATATTGTGTCC 5763

Fig. 6. Continued.

4) Tc-resistant *Vibrio* spp. 에서 나타나는 *tet* 유전자의 총괄적 특성 분석

한국에서 분리된 총 24 Tc-resistant *Vibrio* spp. 중 22개는 multidrug resistant (*tet*(B) and *tet*(M) type)임을 확인 할 수 있었다. 특히 Tn1545-like 와 연관성이 있다고 알려져 있는 EM resistant 특성을 가지고 있는 것도 9 균주 가 발견 되었으나 *erm*(A), (B), (C) resistance genes 중 어느 것도 이런 element에 특이적인 PCR을 실시하여도 positive가 나타나지 않았으며 (Leener 등, 2004, Martel 등, 2005) Tn1545의 transposon 기능을 나타내게 하여주는 *int-Tn* gene 또한 발견 되지 않았다 (Kim et al., 2004). 그러나 3개의 control 균주 OA와 Tc에 내성을 나타내는 *Streptococcus* sp., EM and Tc-resistant strains, SJ14 과 48는 *tet*(S), *erm*(B)을 가지고 있었고 Tc-resistant 이나 EM-sensitive 인 CJ strain 은 *tet*(S)대신에 *tet*(M)을 가지고 있었고 동시에 *int-Tn* gene도 positive로 나타났다. 또 다른 Tn1545-like 와 연관성이 있다고 알려져 있는 내성 유전자는 *aphA3* 로서 kanamycin 내성에 관련되는 것으로 확인 되고 있으나 본 연구에서의 *Vibrio*에서는 발견 되지 않았고 또한 kanamycin에 sensitive 하였다 (Table 5).

Table 5. Tetracycline resistant *Vibrio* spp. and reference strains used in this study (has been published in DAO, 2007)

Strain	Source	Area	Year	Susceptibility to :							tet gene	Int-Tn gene	erm gene	Remark
				Tetracycline (µg/mL)						KM				
				Tc	Mino	OA	ER	PE	CM					
JE1	flounder	Namhae	1993	128	8	R	R	R	R	S	B, M	-	-	
RV5	sea bass	Hadong	1993	64	8	S	R	R	S	S	B, M	-	-	
RV11	flounder	Namhae	1993	64	16	S	S	S	S	S	B, M	-	-	
RV16	flounder	Pohang	1993	64	8	S	S	R	S	S	B, M	-	-	
YV1	flounder	Yeosu	1994	128	16	S	R	R	S	S	B, M	-	-	
YV4	flounder	Yeosu	1994	64	16	R	R	R	S	S	B, M	-	-	
YV5	flounder	Yeosu	1994	128	32	S	R	R	S	S	B, M	-	-	
JV12	sea perch	Pohang	2001	64	8	S	R	R	S	S	B, M	-	-	
JV13	flounder	Namhae	2001	64	8	R	S	R	S	S	B, M	-	-	
JV14	mullet	Yeosu	2001	64	8	S	S	R	S	S	B, M	-	-	<i>Vibrio</i>
JV15	sea perch	Yeosu	2001	128	16	R	S	R	S	S	B, M	-	-	isolates
JV17	sea water	Jeju	2002	64	16	S	S	R	S	S	B, M	-	-	
JV18	flounder	Jeju	2002	128	16	S	S	R	R	S	B, M	-	-	
M1	flounder	Tongyeong	2002	64	32	R	R	R	S	S	B, M	-	-	
M3	sea water	Tongyeong	2002	64	32	S	S	S	S	S	B, M	-	-	
M4	flounder	Tongyeong	2002	64	32	R	R	R	S	S	B, M	-	-	
GV2	sea perch	Geoje	2003	64	16	R	S	R	S	S	B, M	-	-	
GV3	sea perch	Geoje	2003	64	8	S	S	R	R	S	B, M	-	-	
KT1	red sea bream	Geoje	2003	256	16	S	S	R	S	S	B, M	-	-	
KT2	sea perch	Geoje	2003	256	16	S	S	R	S	S	B, M	-	-	
KT4	red sea bream	Geoje	2003	256	16	S	S	R	S	S	B, M	-	-	
KT5	sea perch	Geoje	2003	64	32	R	R	R	S	S	B, M	-	-	
KT7	sea perch	Geoje	2003	64	32	R	S	R	S	S	B, M	-	-	
C35	flounder	Pohang	2003	64	8	S	S	R	S	S	B	-	-	
<i>Streptococcus</i> spp. CJ	flounder	Jeju	2004	64	8	R	S	S	S	S	M	+	-	reference strains
<i>Streptococcus</i> spp. SJ14	flounder	Tongyeong	2003	64	8	R	R	S	S	S	S	-	B	for tet(M) and erm(B)
<i>Streptococcus</i> spp. 48	flounder	Gijang	2005	64	8	R	R	S	S	S	S	-	B	
<i>Edwardsiella tarda</i> RE1											A			reference strains
<i>Escherichia coli</i> C600 R222											B			
<i>Escherichia coli</i> HB101 pBR322											C			for tet genes (Jun et al. 2004)
<i>Escherichia coli</i> HB101 pPT3											D			
<i>Aeromonas hydrophila</i> HA											E			
<i>Escherichia coli</i> C600 pJA8122											G			
* <i>Vibrio alginolyticus</i> : YV1, JV12, JV18														
<i>Vibrio vulnificus</i> : KT1, KT2														
<i>Photobacterium damsela</i> : JE1, RV5, RV16, YV5, JV13, JV15, M1, GV2														
Unidentified strains : RV11, YV4, JV14, JV17, M3, M4, GV3, KT4, KT5, KT7														

4. 결 론

Tc 내성 조사를 위하여, 1993년에서 2003년에 이르는 기간 동안 해수, 해산어의 장 및 병어로부터 어병 세균을 분리하였다. 분리한 세균들 중 가장 다수를 차지하는 *Vibrio* spp.는 수중에 산재하고 있으며, 어체가 약해지는 경우나 환경 악화에 의한 스트레스 조건 하에서 질병을 야기할 수 있는 병원성을 지닌 세균이다 (Berg, 1995). 이러한 *Vibrio* spp.에는 *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. furmissii*, *V. hollisae*, *V. damsela*, *V. alginolyticus* 등 많은 종류가 존재하고 있으며, 척추동물과 어류를 비롯한 무척추동물의 표면이나 내부 장기에 집락을 형성한다 (Zanetti *et al.*, 2001).

한국의 수생 환경중의 *tet* gene의 분포를 PCR 기법으로 결정해보기 위해서, 한국 근해로부터, 수년에 걸쳐 tetracycline에 내성을 나타내는 32종의 *Vibrio* spp.와 16종의 장내 세균을 분리하였다. Efflux gene인 *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* 그리고 *tet(G)*을 검출하기 위한 multiplex PCR 방법에 의해 분리 균주들을 테스트한 결과, 장내 세균에서는 다양한 종류의 *tet* gene이 검출되었으나, *Vibrio* spp.에서는 여섯 개의 *tet* gene 중 *tet(B)* 만이 나타났다. 또 *tet(K)*, *tet(L)* 및 *tet(M)*에 대한 특이적인 primer를 사용하여 분리 균주들을 시험해본 결과, 장내 세균 중에서 *tet(K)*와 *tet(M)*를 지닌 균이 각각 1균주씩 검출되었고, 놀랍게도 모든 *Vibrio* spp.에서는 ribosomal protection gene인 *tet(M)*이 검출되었다. 따라서 한국에서 발견된 모든 *Vibrio* spp.에서는, *tet(B)*와 함께 *tet(M)*이 tetracycline 내성 인자로서 존재한다는 것을 알 수 있었다. 두 가지 주요한 *tet(M)*인 Tn916과 Tn1545의 *tet(M)*의 염기 서열의 conserved region과 variable region으로부터 증폭산물의 크기가 다르도록 제작된 primer들을 이용하여 multiplex PCR을 실시한 결과, 한국의 수생 환경에서 분리된 모든 *Vibrio* sp.는 Tn1545에서 유래된 *tet(M)*을 지니고 있었음이 확인되었다. 반면, 장내세균의 하나인 CJV23의 경우, Tn916으로부터 유래된 *tet(M)*을 지니고 있었으며, *Vibrio* spp.와 CJV23의 *tet(M)*의 염기 서열을 분석하여 보고되어 있는 Tn1545 및 Tn916

의 *tet(M)*과 비교하였다.

*Tet(B)*와 *tet(M)*에서 제작된 primer들을 조합하여, DNA 선상에서 두 유전자의 방향과 거리에 따라 PCR의 증폭 산물이 생성되도록 하여, *tet(B)*와 *tet(M)*의 상대적인 거리에 대해 알아보려고 하였다. 그 결과, *tet(B)*상의 한 primer와 *tet(M)*상의 한 primer에 의해 증폭산물이 생성되었으며, 분석 결과, *tet(M)*은 *tet(B)*의 3' end와는 2,536bp 떨어진 거리에 위치하고 있었으며, *tet(B)*를 포함하고 있는 Tn10의 바로 뒤에 위치하고 있었다. 본 연구에서는, *Vibrio spp.*에서, efflux gene인 *tet(B)*와 ribosomal protection gene인 *tet(M)*이 동시에 존재함을 보였는데, *tet(B)*와 *tet(M)*이 동시에 존재한다는 이전의 보고는 없었으나, 이와 흡사하게 *Acinetobacter baumannii*를 실험 균주로 사용하였을 때, efflux gene의 하나인 *tet(A)*와 *tet(M)*이 함께 존재한다는 보고가 있었다 (Riberta *et al.*, 2003).

제 6 절 수입산 어류의 장내 세균에서의 항생제 내성균 비율과 *tet* 유전자 분석

1. 총 론

양식 현장에서 발생하는 세균성 질병의 치료를 위하여 우리나라에서는 많은 양의 항생제가 사용되어지고 있으며, 더구나 새로운 병원체에 의한 어류 질병 발생이 증가함에 따라 항생제의 사용 빈도수가 점차 증가 추세에 있다. 그 결과 다양한 항생제에 대한 내성균의 출현이 양식 현장에서 가장 큰 문제로 나타나고 있다 (Smith et al., 1994). 그 중 특히 tetracycline (Tc)은 광범위 항생물질로서 양식 산업에서 널리 사용되고 있는 대표적인 항생제이나 약물의 무분별한 사용으로 인하여 Tc에 대한 내성균 빈도가 증가하였으며, *tet* 유전자들이 양식 현장 또는 어류의 장내 세균에서도 많이 보고되었다. 현재 우리나라의 경우는 해산어 양식에 있어 Tc의 내성 비율에 대해서는 미비하게 조사가 이루어져있으나 내성균의 발생 및 특정 *tet* 유전자로 인한 내성 정도의 차이에 대한 조사는 진행되고 있지 못한 실정이다. 본 연구에서는 우리나라 해산어의 장내 세균들이 다양한 항생제에 대해 어느 정도의 내성 비율을 보이는지 확인하고자 하였으며 어떤 종류의 *tet* 유전자가 분포되어 있는지 분석해보고자 하였다. 그리고 현재 중국이나 일본으로부터 수입되어 들어오는 해산어의 장내 세균들에 있어서 Tc에 대한 내성 비율과 내성 유전자 분포에 대해서도 분석을 실시하였다.

또한 관상어 교역에 대한 정확한 실태 조사가 되지 않아 보다 실질적인 조사와 관리가 실시되고 있지 못하므로 이에 대한 지침 마련의 중요성이 증대되고 있다. 따라서 본 연구에서는 수입된 관상어 장내 세균에서 존재하는 세균의 여러 항생제에 대한 내성 및 내성 유전자 특성 비교도 함께 실시하였다.

2. 방 법

가. Sampling

조피볼락과 넙치로부터 장을 분리한 후 증장 0.5g을 5ml의 0.15M PBS 완충용액에 현탁시켜 분쇄하였다. 10배씩 단계 희석한 후 희석액을 0.45 μ m (pore size) membrane filter에 통과시켜 고정하였으며, filter에 고정된 세균을 1% NaCl 첨가 TSA배지와 tetracycline (16 μ g/ml)이 첨가된 1% NaCl 첨가 TSA배지의 표면과 부착되도록 하였다. 이 agar plate를 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 각각의 plate에서 자란 colony수를 확인하여 내성 빈도를 백분율로 계산하였다. 수입된 중국의 점농어와 일본의 참돔 그리고 수입된 각종 관상어에 대하여서도 동일한 방법으로 실험을 실시하였다.

나. Antibiotic resistance test

Ampicillin (Am), Chloramphenicol (Cm), Oxolinic acid (OA), Tetracycline (Tc), Streptomycin (St), Sulfadiazine (SF) 을 사용하여 약제 감수성 실험을 실시하였으며, 사용된 항생제는 모두 sigma에서 구입하여 사용하였다.

다. PCR test

Tc (30 μ g/ml)가 첨가된 배지에서 자란 colony를 50개정도 취하여 TSB에 접종한 후 25 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양하였다. 배양액으로부터 분리된 whole cell은 multiplex PCR을 위한 template로 이용되어졌다 (Jun et. al., 2004).

3. 결과 및 결론

이전 3개월간 항생제를 투여한 적이 없는 우리나라의 양어장으로부터 얻은 조피볼락과 넙치를 시료로 하여 TCBS, CC 선택배지를 이용한 장내 세균의 분포 분석에서 장내 세균의 48~68%, 10~33%는 각각 *Vibrionaceae*, *Enterobacteriaceae* 계열로 확인되었다. 이중 Tc, Am, Cm, OA, St, SF에 대하여 *Vibrionaceae*는 46%, 48%, 33%, 8%, 23%, 53%, *Enterobacteriaceae*는 10%, 22%, 3%, 8%, 15%, 5%의 내성 비율을 보여 주었다 (Table 1). Tc 30 μ g/ml이 첨가된 ST 배지로부터 무작위로 분리한 50개의 내성균이 가지고 있는 *tet* 유전자를 각각 분석한 결과 *tet*(A)와 *tet*(B)가 20%, 60%로써 *tet*(B)가 major type 으로 확인되었다 (Table 2). 이러한 결과는 장내 세균에서 높은 출현 빈도를 보이고 Tc에 대해서도 46%의 내성균 비율을 나타내는 *Vibrionaceae* 계열의 균주에 의하여 큰 영향을 받은 것으로 추정된다. Marine environment에서 내성균의 *tet* 유전자 활용을 비교 분석하기 위하여 락토즈를 분해하는 장내 세균을 (Ent-lac+) CC배지를 이용하여 선별하였다. Ent-lac+ 균은 *tet*(A) 유전자가 major로 존재하는 것으로 확인되었다. 우리나라에서 조사된 Tc 내성 비율이나 *tet* 유전자 분포를 외국의 경우와 비교하기 위하여 중국이나 일본으로부터 수입된 해산어를 이용하여 5회에 걸쳐 실험을 실시하였다. Tc가 첨가된 ST 배지에서 중국의 경우는 3~31%로 다양한 내성 비율을 나타내었으며 일본은 33~55%의 내성 비율을 나타내 우리나라나 중국에 비해 다소 높은 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 내성 유전자의 분포를 확인해 본 결과 *tet*(B)와 *tet*(A)에 편중되어 있는 우리나라의 경우와는 달리 중국은 *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(K)를 가지는 것으로 일본은 *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D)등이 분포하는 것으로 나타났으나 (Table 3) 균주의 다양성 때문인지는 추후 확인이 필요하다.

그리고 수입된 관상어 장내 세균에서 나타나는 항생제 내성 비율이 Table 4에 나타난다. Tc의 경우 우리나라에서 양식된 담수 관상어 장내 세균에서 약 39%의 내성 비율이 나타났다. 이는 대만 (7%)을 제외한 싱가포르 48%, 중

국 58%, 태국 87%, 인도네시아 88%를 나타낸 수입된 관상어 장내 세균의 내성 비율에 비해 다소 낮은 수치이다. 태국, 인도네시아에서 87%와 88%의 높은 Tc내성 비율이 나타난 반면 중국과 싱가포르에서는 우리나라에 비해 약 10%정도 높은 내성수치가 나타났다. 또한 장내 세균에서 나타나는 Tc 내성 비율이 다른 항생제 내성 비율에 비해 다소 높았다. Ampicillin (amp)의 경우 우리나라에서 20%, 싱가포르에서 21%, 태국에서 56%, 인도네시아에서 41%, 중국 32%가 확인 되었으며 여전히 대만에서는 4%의 낮은 내성 분포가 나타났다. 여전히 대만에서는 가장 낮은 수치의 내성 비율이 나타났으며, 다른 나라에 있어서도 대체적으로 Tc에 비해 낮은 내성 비율이 관찰되었다. Erythromycin의 각 나라별 내성 비율은 인도네시아 (78%)와 중국 (41%)를 제외한 대부분 국가에서 우리나라 19%, 싱가포르 17%, 태국 21%, 대만 6%로 낮게 나타났다. 반면 Oxolinic acid 경우에는 태국과 인도네시아에서 여전히 83%와 88%의 높은 내성 비율 수치가 확인 되었으며 우리나라와 싱가포르, 중국에서는 48%, 39%, 및 49%의 내성 비율이 나타났다.

Table 1. Percentages of antimicrobial resistance detected among the total bacteria and within *Vibrionaceae* and *Enterobacteriaceae* isolates in marine fishes of Korea

Fish species	Strain (%)	% Resistance					
		Tc	Am	Cm	OA	St	SF
Flounder							
(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Vibrionaceae</i> (48)	40	57	37	10	26	64
	<i>Enterobacteriaceae</i> (33)	14	18	2	7	11	5
Rockfish							
(<i>Sebastes schlegeli</i>)	<i>Vibrionaceae</i> (68)	52	39	29	6	20	42
	<i>Enterobacteriaceae</i> (10)	6	26	4	9	19	5

Tc; tetracycline, Am; ampicillin, Cm; chloramphenicol, OA; oxolinic acid, St; streptomycin, SF; sulfadiazine

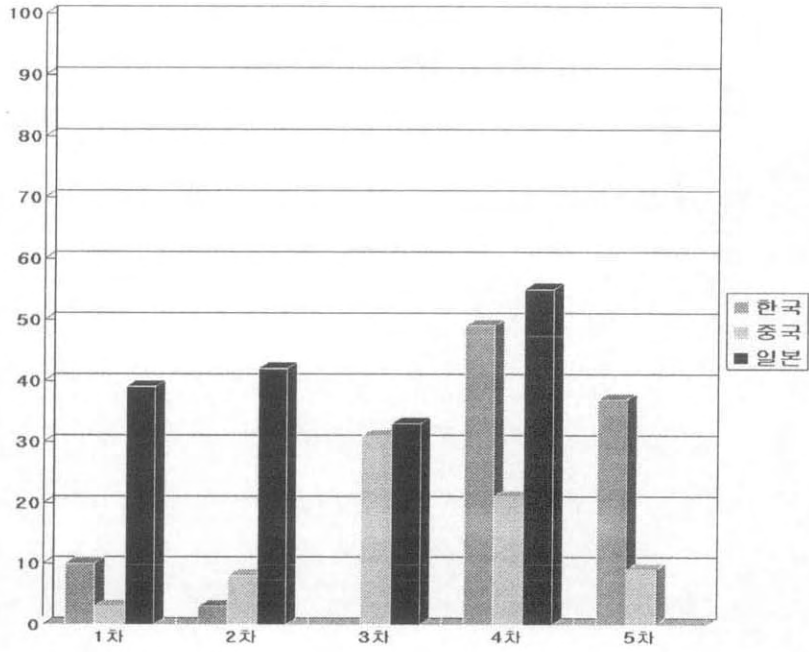


Fig. 1. Frequencies of Tc resistant bacteria in microflora of fishes cultured in different countries.

Table 2. Distribution of *tet* genes in the isolates from marine fishes of Korea

Strain	No. of Isolates	% <i>tet</i> genes (No.)			
		<i>tet</i> A	<i>tet</i> B	<i>tet</i> D	<i>tet</i> E
<i>Vibrionaceae</i>	30	0	100 (30)	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	13	76 (10)	0	0	15 (2)
Unidentified	7	0	0	28 (2)	0
Total	50				

Table 3. Distribution of *tet* genes in heterogenous Tc resistance isolates from marine fishes of Korea, China and Japan

<i>tet</i> genes	Korea (150*)	China (150)	Japan (150)
<i>tet</i> B	69 (103)	47 (70)	34 (51)
<i>tet</i> C	0	4 (6)	19 (29)
<i>tet</i> D	21 (31)	27 (40)	29 (43)
<i>tet</i> K	0	5 (8)	0
ND	10 (16)	17 (26)	18 (27)

* : numbers of isolates analyzed, ND=not detected

Table 4. Resistance of the intestinal isolates to different antimicrobial agents (%)

	Korea	Singapore	Thailand	Taiwan	Indonesia	China
[TSA (Tc 10 µg/ml) /TSA]	39	48	87	7	88	58
TcR-Ent-lac+	41	61	46	34	96	56
[TSA (Amp 30 µg/ml) /TSA]	20	21	56	4	41	32
AmpR-Ent-lac+	28	28	36	24	31	35
[TSA (Ery 15 µg/ml) /TSA]	19	17	21	6	79	41
EryR-Ent-lac+	18	38	19	19	32	63
[TSA (OA2 µg/ml) /TSA]	48	39	83	9	88	49
OAR-Ent-lac+	48	68	72	86	89	38

TcR-Ent-Lac+ were screened on the CC and CC agar plate contained 10 µgTc/ml for total intestinal bacteria and lactose fermenting Enterobacteria (Ent-lac⁺) isolates respectively.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목 표	세부 내용	달성도
QN 및 Pe의 내성 (1차년도, 2005 년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>E.tarda</i> 3 개 QN 내성 유전자 cloning ○ <i>Vibrio</i> spp.의 bla 유전자 분포와 특성분석 ○ QN 내성의 특성 분석과 monitoring ○ 새로운 type 의 내성 유전자 추적 	100 100 100 100
tet 유전자 분석 (2차년도, 2006 년)	<ul style="list-style-type: none"> ○ tet 유전자의 screening 기법 확립 ○ 수입어 및 관상어에서의 내성 유전자 분석 ○ <i>in vivo</i>에서의 내성 유전자 변화 추적 ○ 국가간 장내 세균 내성 유전자 비교분석 	100 100 100 100
관련 분야에의 기여 수준	<ul style="list-style-type: none"> ★ 수산생물에서의 내성 유전자 특성 분석 ★ 내성 유전자의 분포 분석 및 확인 ★ 새로운 내성 관련 유전자 확인 	탁월

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구는 여러 다른 내성균이 갖는 내성 유전자의 변화된 특이적 염기배열을 확인 할 수 있게 하여 줄 것이므로 증가하고 있는 내성균의 특이적 분별과 그 내성 특성의 원천을 이해할 수 있게 되고 이는 향후 이식경로 등의 파악을 가능케 하여 근원적인 차단책 마련이 가능케 줄 수 있다.
- 현재 세계 각국에서 양식업의 활성화를 위하여 많은 노력들을 기울이고 있는 실정이며 이의 일환으로 수입되어 들어오는 종묘 또는 활어에 대한 검역사업에 대한 중요성이 국가적으로 인식 되어지고 있으므로 수입어류에 의한 이식산 내성균의 전파 가능성에 대한 경보 체계에 중요한 정보를 제공할 수 있음.
- 국제적으로 분쟁의 소지가 있을 때 활용성이 높은 gene database일 것임.
- 그러므로 향후 본 연구의 활용은 관상어 또는 해산어에서 증대되고 있는 내성균의 진원지가 어디냐 하는것에 대한 과학적인 접근이 가능 하게 될 것이므로 경제적으로나 외교적측면 모두에서 본 연구는 그 의미가 매우 크며 국가간 또는 수출입업자 간에 나타나는 분쟁해결을 위한 과학적인 조사방법과 준비된 자료를 본 연구를 통하여 제공 할 수 있음.
- 향후 수산물의 원산지판명 등에 본 연구의 기법과 개념을 적용 하고자 함.
- 내성 유전자의 발현과 조절이라는 기초학문적 분야적인 측면의 접근이 비교적 약하게 이루어졌으므로 이에 대한 보충 연구는 필요하다고 사료됨.

제 6 장 참고 문헌

- Aarestrup, F. M., Bager, F., Jensen, N. E., Madsen, M., Meyling, A. and Wegener, H. C. (1998) Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS*, 106, 745 - 770.
- Akasaka, T., Onodera, Y., Tanaka, M. and Sato, K. (1999) Cloning, Expression, and Enzymatic Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 530-536.
- Aminov R. I., Chee-Sanford C. C., Garrigues N., Teferedegne B., Krapac I. J., White B. A., and Mackie R. I. (2002) Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria. *Applied And Environmental Microbiology*, 68, 1786-1793.
- Aoki, T. (1988) Drug resistant plasmids from fish pathogen. *Microbiology Science.*, 5, 219-223.
- Aoki, T. (1992) Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. *Diseases in Asian. Aquaculture*, 1, 519-529.
- Aurora, F. A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. and Barcina, I. (1992) Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 392-398.
- Barbeyrac B, Dupon M, Rodriguez P, Renaudin H, Bebear C (1996) A Tn1545-like transposon carries the *tet(M)* gene in tetracycline resistant strains of *Bacteroides ureolyticus* as well as *Ureaplasma urealyticum* but not *Neisseria gonorrhoeae*. *J Antimicrob Chemother*, 37, 223-232.
- Bébéar, C. M., Charron, A., Joseph, M. B., Bébéar, C. and Renaudin, J.

- (1998) Cloning and Nucleotide Sequences of the Topoisomerase IV *parC* and *parE* Genes of *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2024-2031.
- Bell, G. R., Traveler, G. S. and Dworschak, C. (1988) Development in vitro and pathogenicity of an erythromycin-resistant strain of *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of bacterial kidney disease in salmonids. *Disease of aquatic organism*, 4 19-25.
- Berg, O. (1995) Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., inhibit growth of a pathogenic *Vibrio* sp. *J. Fish Dis.*, 18, 31-40.
- Bert. F., Branger, C. and Lambert-Zechovsky, N. (2002), Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 11-18.
- Brenda S. S., Nadia B. S., Abigail A. S. (1992) Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance. *Clinical Microbiology Review.* 5, 387-399.
- Briggs, D. E. and Fratamico, P. M. (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 846-849.
- Brinas L, Zarazaga M, Saenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. (2002) Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 3156-63.
- Burdett, V. (1986) Streptococcal tetracycline resistance mediated at the level of protein biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 165: 564-569.
- Chen, W. and Kuo, T. (1993) A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21, 2260.

- Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotic: mode of action, application, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Micribiology and Molecular Biology*, 65, 232-260.
- Clark RB, Lister PD, Janda JM. (1991) In vitro susceptibilities of *Edwardsiella tarda* to 22 antibiotics and antibiotic-beta-lactamase-inhibitor agents. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 14, 173-175.
- Dantley, K. A., Dannely, H. K. and Burdett, V. (1998) Binding interaction between Tet(M) and the ribosome: requirements for binding. *J. Bacteriol.*, 180, 4089-4092.
- DePaola, A., Flynn, P. A., McPhearson R. M, Levy S. B. (1988) Phenotypic and genotypic characterization of tetracycline and oxytetracycline resistance *Aeromonas hydrophilia* from cultured channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and their environments. *Appl Environ Microbiol.*, 54, 1861-1863.
- Depaola, A., Hill, W. E. and Harrell, F. M. (1993) Oligonucleotide probe determination of tetracycline resistant bacteria isolated from catfish ponds. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 345-348.
- Ervik, A., Thorsen, B., Eriksen, V., Lunestad, B. T. and Samuelson, O. B. (1994) Impact of administering antibacterial agent on wild fish and blue mussels *Mytilus edulis* in the vicinity of fish farm. *Diseases Aquatic Organism*, 18, 45-51.
- French, G., and Schwarz, S. (1999) Plasmid-encoded tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars choleraesuis and typhimurium: identification of complete and truncated Tn1721 elements. *FEMS Microbiol Lett.*, 176, 97-103.
- French, G. and Schwarz, S. (2000) molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul:

- construction and application of specific gene probes. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 633-641.
- Hekton, H., Berge, J. A., Hormazabal, V. and Yndestad, M. (1995) Persistence of agents in marine sediment. *Aquaculture*, 133, 175-184.
- Joris, B., Ledent, P., Dideberg, O., Fonzé, E., Lamotte-Brasseur, J., Kelly, J. A., Ghuysen, J. M. and Frère, J. M. (1991) Comparison of the sequences of class A β -lactamases and of the secondary structure elements of penicillin-recognizing proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35, 2294-2301.
- Jun, L. J., Jeong, J. B., Huh, M. D., Chung, J. K., Choi, D. L., Lee, C. H., and Jeong, H. D. (2004) Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture*, 240, 89-100.
- Kado, C. I. and Liu, S. T. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145, 1365-1373.
- Kerry, J., Hiney, M., Coyne, R., Cazabon, D., NicGahainn, S. and Smith, P. (1994) Frequency and distribution of resistance to oxytetracycline in micro-organisms isolated from marine fish farm sediments following therapeutic use of oxytetracycline. *Aquaculture*, 123, 43-54.
- Kim, E. H. and Aoki, T. (1993) The structure of the chloramphenicol resistance gene on transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiology Immunology*, 37, 705-712.
- Kim SR, Nonaka L, Suzuki S (2004) Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol Lett*, 237, 147-156.
- Kim, Y. H., Jun, L. J., Park, S. H., Yoon, S. H., Chung, J. K., Kim, J. C., Jeong, H. D. (2007) Prevalence of *tet(B)* and *tet(M)* genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environment of Korea.

- Dis. Aqua. Org.*, 75, 209-216.
- Lartigue MF, Leflon-Guibout V, Poirel L, Nordmann P, Nicolas-Chanoine MH. (2002) Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from bla(TEM) genes and their relationship to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 46, 4035-4037.
- Lee, C., Langlois, B. E. and Dawson, K. L. (1993) Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1467-1472.
- Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F (2004) Distribution of the *erm(B)* Gene, Tetracycline Resistance Gene, and Tn1545-like Transposons in Macrolide- and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans. *Microbial Drug Resistance* 10, 341-345.
- Levy, S. B., McMurry, L. M., Barbosa, T. M. *et al.* (1999) Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1523 - 1524.
- Marco, R. O., Christopher, G. D., John, M. S., Roberta, P., and Ginni, P. (1996) The Tetracycline resistance *tet(M)* Exhibit Mosaic Structure. *PLASMID*, 35, 156-163.
- Marshall, B. C., Tachibana, C. and S. B. Levy. (1983) Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24, 835-840.
- Martel A, Decostere A, Leener E, Marien E, Graef E, Heyndricx M, Goossens H, Lammens C, Devriese LA, Haesebrouck F. (2005) Comparison and Transferability of the *erm(B)* Genes between Human and Farm Animal Streptococci. *Microbial Drug Resistance*, 11, 295-302.
- McPhearson, R. M., DePaola, A., Zywno, S. R., Motes Jr., M. L. and Guarino, A. M. (1991) Antibiotic resistance in gram-negative bacteria

- from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99, 203-211.
- Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S. and Roberts, M. C. (2003) Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Bacteria from Chilean Salmon Farms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 883-888.
- NCCLS, (2000) Method for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard 5th ed. NCCLS Document M7-A5. *National Committee of Clinical Laboratory Standards*. Wayne, PA, USA. ISBN 1-56238-394-9.
- NCCLS, (2001) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eleventh informational Supplement. NCCLS Document M100-S11. *National Committee of Clinical Laboratory Standards*. Wayne, PA, USA. ISBN 1-56238-426-0.
- Ottaviani D, Bacchiocchi I, Masini L, Leoni F, Carraturo A, Giammarioli M, Sbaraglia G. (2001) Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *Int J Antimicrob Agents.*, 18, 135-140.
- Pai, H.J, Lyu, S., Lee, J.H., Kim, J. and Kwon, Y. (1999) Survey of Extended-spectrum beta-lactamase in KOREA isolates of Enterobacteriaceae. *Yonsei Medical Journal*, 39 514-519.
- Pursell, L., Dineen, T., Kerry, J., Vaughan, S. and Smith, P. (1996) The biological significance of breakpoint concentration of oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*, 145, 21-30.
- Riberta, A., Ruiz, J. and Vila, J. (2003) Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 2310-2312.
- Roberts, M. C. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanisms of

- action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 19, 1-24.
- Rhodes, G. G., Huys, J., Swings, P., McGann, M., Hiney, P. S. and Pickup, R. W. (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonas sp* in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tet(A)*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3883-3890.
- Roberts, M. C., Pang, Y., Riley, D. E., Hillier, S. L., Berger, R. C. and Krieger, J. N. (1993) Detection of Tet M and Tet O tetracycline resistance genes by polymerase chain reaction. *Molecular and cellular probes.*, 7, 387-393.
- Samuelsen, O. B., Torsvik, V. and Ervik, A. (1992) Long-range changes in oxytetracycline concentration and bacterial resistance toward oxytetracycline in a fish farm sediment after medication. *Sci. Total Environ.*, 114, 25-36.
- Schmidt, A. Bruun, S., Dalsgaard, M. S., Pedersen, I. K. and Larsen, J. (2000) Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacterial associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4908-4915.
- Schwaber MJ, Raney PM, Rasheed JK, Biddle JW, Williams P, McGowan JE Jr, Tenover FC. (2004) Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-*Escherichia coli* and *Non-Klebsiella spp.* of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.*, 42, 294-298.
- Shin, S. B., Yoo, M. H., Jeong, J. B., Kim, Y. M., Chung, J. K., Huh, M. D., Komisar, Jack L. and Jeong, H. D. (2005) Molecular cloning of the *gyrA* gene and characterization of its mutation in clinical isolates of quinolone resistant *Edwardsiella tarda*. *Dis. Aqua. Org.*, 27, 259-266.

- Smith, P., Donlon, J., Coyne, R. and Cazabon, D. J. (1994) Fate of oxytetracycline in a fresh water fish farm : influence of effluent treatment systems. *Aquaculture*, 120, 319-325.
- Spanggard, B., Jorgensen, F., GramandH, L., Huss, H. (1993) Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and unpolluted stream in Denmark. *Aquaculture*, 115, 195-207.
- Stamm, J. M. (1989) In vitro resistance by fish pathogen to aquacultural antibacterial including the quinolones difloxacin(A-56619) and sarafloxacin(A-56620). *Journal of Aquatic Animal Health*, 1, 135-141.
- Stock I, Wiedemann B. (2001) Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45, 2245-2255.
- Sturenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. (2004) Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum beta-lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 54, 134-138.
- Teo, J. W., Tan, T. M. and Poh, C. L. (2002) Genetic Determinants of tetracycline Resistance in *Vibrio harvey*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46 , 1038-1045.
- Trust T. J. and Whitby, J. L. (1976) Antibiotic resistance of bacteria in water containing ornamental fishes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10, 598-603.
- Twiddy, D. R. and P. J. A. Reilly. (1994) Occurrence of antibiotic resistant human pathogens in integrated fish farm. Research contributions presented at the ninth session of Indo Pacific fishery commission working party on fish technology and marketing. *Cochin, India, March, Rome, Italy* FAO, 514, 23-37.

- Usman, C. W., Masato, M., Takashi, I., Rtoichi, O., Totoji, O., Chieko, S., Akio, K. (1996) Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian Countries by the Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Antibiotics.*, 49, NO.11.
- Vaughan, S., Coyne, R. and Smith, P. (1996) The critical importance of sample site in the determination of the frequency of oxytetracycline resistance in the effluent microflora of a fresh water fish farm. *Aquaculture*, 139, 47-54.
- Woods, G. L. and Washington, J. A. (1995) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of Clinical Microbiology* 6th edn., *American Society for Microbiology, Washington, DC.*, 1327-1341.
- Yamaguchi, A. T., Udagawa and Sawai, T. (1990) Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 4809-4813.
- Zanetti, S., Spanu, T., Deriu, A., Romano, L. and Fadda, G. (2001) In vitro susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *Int Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 407-409.
- Zhao, J. and Aoki, T. (1992) Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiology and Immunology*, 36, 1051-1060.
- 김명석. (1997) 환경적 변화에 따른 나일틸라피아의 Oxolinic acid 흡수와 배설. 부경대학교 어병학과 석사 논문.
- 김영화. (2004). 해수 어류에서 분리된 *Vibrio* spp.의 tetracycline 내성 유전자의 특징. 부경대학교 대학원 석사논문.
- 김은희. (1999) 넙치에서 분리된 *Edwardsiella tarda* 의 약제내성 전달성 R plasmid. 한국어병학회지, 제 12 권, 115-122.

- 유민호. (2000) 어병 세균에서Chloramphenicol 내성 유전자 분포와 R plasmid. 부경대학교 어병학과 석사논문.
- 이종호. (2003) 부산 도축장에서 분리된 E. coli의 ESBL(Extended-spectrum -lactamase)성상 연구. 부경대학교 미생물학과 석사논문.
- 최민순, 김영길. (1994) 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성과 R plasmid. 한국어병학회지, 제 7권, 37-46.
- 최민순, 최상훈, 박관하. (1996) 뱀장어 병어로부터 분리한 *Edwardsiella tarda*의 약제 내성. 한국어병학회지, 제 9권, 195-201.

별 첨 : 자체평가의견서

1. 과제현황

		과제코드	22005019		
사업구분	수산기술개발사업				
과제구분	(총괄)	(주관)	과제성격	(기초)	
총괄과제명	우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석				
주관기관	부경대학교		주관연구책임자	정 현도	
과제명	우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석				
연구기관	부경대학교		연구책임자	정 현도	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2005. 9. 14- 2006. 9. 13	40,000		40,000
	2차년도	2006. 9. 14- 2007. 9. 13	45,000		45,000
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		85,000		85,000
참여기업					
상대국		상대국연구기관			

2. 평가일 : 2007. 9. 5

3. 평가자(연구책임자)

소속	직위	성명
부경대학교	교수	정 현도

4. 평가자(연구책임자) 확인

- 본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본자료가 전문위원회 및 사업조정관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

- 1) 수산생물에서 가장 중요한 세균인 *E. tarda*, *Vibrio* spp. 그리고 장내세균이라는 3 분류 각각에서의 Pe, QN 그리고 Tc 내성균의 분리와 특성 분석이라는 연구가 이루어졌음.
- 2) 또한 새로운 유전자 cloning과 특성 분석과 함께 기 확보 되었던 내성균을 활용한 1997-2006년까지의 유전자 변화에 대한 monitoring도 함께 실시되어 시기별 변화를 추정 하게 하는 성과를 이루었음.
- 3) Multiplex PCR기법의 개발이 이루어져다양한 분야에의 적용이 가능하게 하는 효과를 이루었음.
- 4) *in vivo* 실험으로서 인접국의 어류 장 내에 있는 내성균의 level을 분석하여 이식성 어류의 위험성을 제고케 하였다.
- 5) 결론적으로 보면 최초의 유전적 내성균 연구로서 monitoring 까지 실시하여 그 의미의 탁월성을 더하여 주고 있다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

- 최초의 국내 내성균이 함유하고 있는 다양한 유전자에 대한 많은 분석이 매우 세심하게 이루어 졌음.
- 수입되어 들어오는 종묘 또는 활어에 대한 검역사업에 대한 중요성이 국가적으로 인식 되어지고 있으므로 수입어류에 의한 이식성 내성균의 전파 가능성에 대한 경보 체계에 중요한 정보를 제공 할 수 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

- 우리나라의 내성균에 대한 체계적이고 과학적인 분석임.
- 내성균의 *parC*, *parE*, *gyrB* 특성 분석 새로운 type의 *bla* gene 분석, 모두 우리나라의 과학적인 수산업의 과학화에 대한 세계적 증거로서 이용될 것임.
- Tc 내성유전자의 모든 특성 분류가 이루어 졌음
- Multiplex PCR기법의 개발
- 이루어진 data는 향후 모든 연구의 기초가 될 것임.
- 최초의 국내와 국외의 내성균이 함유하고 있는 다양한 유전자의 비교 분석이 이루어 졌음.
- 수입되어 들어오는 종묘 또는 활어에 이식산 내성균의 전파 가능성에 대한 정보 체계 확립.
- 다만 본 연구의 특성 자체가 생산성 증대 보다는 분석에 초점이 이루어져 있어 활용을 위한 기초 지식이 있어야 한다는 요구사항이 있다고 할 수 있다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

매우 방대한 작업을 2년간에 실시하여 매우 탁월한 성실성으로 이루어 졌다고 할 수 있음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 산업재산권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

A. 연구 발표 :

- 1) 2006년도 수산관련학회 공동학술대회 발표 2006. 5. 19
김재훈 전려진 류지효 조혜진 정준범 정현도
돌돔의 장내 세균총에서 분리한 *Vibrio* spp.의 항생제 내성 특성 분석
- 2) 2006년도 수산관련학회 공동학술대회 발표 2006. 5.19
박신후 전려진 정준범 류지효 윤소혜 정현도
Vibrio spp.에서 나타나는 새로운 type의 *tet*유전자 특성 분석
- 3) 2006년도 수산관련학회 공동학술대회 발표 2006. 5.19
전려진 류지효 윤소혜 정현도
Tetracycline 경구 투여가 조피블락의 장내 내성균 비율 변화와 *tet*유전자 분포에 미치는 영향
- 4) 2006년도 추계 한국 어병학회 2006.11.03
윤소혜 김영화 전려진 김주현 조혜진 정현도
Detection of *tet* gene in *Vibrio* spp. using multiplex PCR
- 5) 2006년도 추계 한국 어병학회 2006.11.03
전려진 박신후 정지윤 남정희 김주현 정현도
해산어 장내 세균에서의 tetracycline 내성 비율과 *tet* 유전자 분석
- 6) 2007년도 한국수산과학 총연합회 공동학술대회 2007.5.18
전려진 김광일 정현도
Detection of ParC mutation in quinolone resistant *Edwardsiella tarda* using real-time PCR
- 7) 2007년도 한국수산과학 총연합회 공동학술대회 2007.5.18
윤소혜 신기원 정지윤 정현도
해산어 및 담수 관상어 장내 세균의 tetracycline 내성 유전자의 정량적 분석

B. 논문 발표

- 1) 김영화 전려진 박신후 윤소혜 정준기 김재철 정현도 2007. 5.
Prevalence of *tet(B)* and *tet(M)* genes among tetracycline-resistant *Vibrio* spp. in the aquatic environments of Korea. (2007) Diseases Of Aquatic Organisms (SCI. IF 2.2) 75, 209-216.
- 2) 전려진 · 정준범 · 김재훈 · 정현도 2007. 9
Distribution of *tet* genes in the microorganisms isolated from marine-aquatic environments of Korea. (2007) 한국 어병학회지 (등재지) vol 20, 2.

C. 본 연구 내용을 활용한 특강

발표자 : 정현도 2007. 8. 28

주관 : 동물용 의약품 WORKSHOP (부산 지방 식품의약 안전청)

제목 : 동물용 항생제 사용의 관리동향과 저감화 방안 : 수산용 항생제를 중심으로

D. 본 연구를 통한 인력 양성

석사 4명 : 전려진, 김재훈, 박신후, 김영화

박사과정 1명 : 전려진

II. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	<i>E. tarda</i> 3 개 QN 내성 유전자 cloning	- QN 내성의 특성 분석과 monitoring - Mutant를 활용한 향후의 진전 방향까지 제시	100
2	<i>Vibrio</i> spp.의 bla 유전자 분포와 특성분	- 대부분의 bla 유전자에 대한 Monitoring - VAK-1 cloning	100
3	<i>tet</i> 유전자의 screening 기법 확립	- Multiplex PCR 기법 확립 - 장내, <i>Vibrio</i> 등 다양한 균으로부터 내성유전자 활용 상황 분석 완료 - 우리나라 <i>Vibrio</i> 균의 <i>tet</i> 유전자 활용의 특이성 보고 - <i>Streptococci</i> 의 유전자 및 erm(B)의 변화 까지 분석 완료	100
4	수입어 및 관상어에서의 내성 유전자 분석	- 6개국으로부터의 수입활어에서 나타나는 내성균의 수준과 유전자 분석 비교	100
5	<i>in vivo</i> 에서의 내성 유전자 변화 추적	- 약제 투여가 내성균의 유전자 활용에 미치는 영향을 최초로 분석	100

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 방대한 작업이고 너무나 많은 인적 노동력이 필요한 연구라고 할 수 있음.
- 각 항생제에 대한 내성균의 유전적 특성, 발현, 내성 유전자 분류 등 처음의 계획보다 더 발전적이고 많은 연구를 실시하였다고 할 수 있음.
- 향후 이러한 연구는 계속 되어질 필요가 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 1) 본 연구의 최초 제안서 심사시 심사위원으로부터 요구 되어진 사항은 최초 연구 제목인 우리나라 수산생물의 세균에서 나타나는 항생물질 내성 결정 유전자의 특성 분석 및 monitoring 에서 monitoring이라는 단어는 개인의 실험실이나 본 연구 경비정도로 실시하기 어려우므로 삭제할 것을 요구 받아 제목에서 삭제 한바 있음. 그러나 monitoring 없는 연구는 너무 순수과학으로 치우치는 경향이 있고 특성 분석을 위한 실험에서도 필요하여 실시하게 되었음. 그 결과 현재 본 연구는 과도한 sample 수, 잦은 출장, 그리고 각각의 sample로부터 분리된 많은 균주에 대한 내성 유전자 각각의 분자 생물학적인 분석에 의하여 연구 load 및 경비에서 상대적으로 과잉의 노력과 투자가 필요 하였음.
- 2) 본 연구는 생산성을 위주로 하는 연구가 아니라 현재 우리나라의 내성균이 가지고 있는 내성 유전자가 국내외적으로 어떠한 상황에 있는지를 분석하고 그 위험성에 대한 제고를 위한 기초 자료를 확립하는데 있으므로 산업체 연계 또는 생산량증대 등의 평가 기준과는 다른 개념으로 평가가 이루어 져야 함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 외국산 어류에 대한 보다 정밀 조사가 이루어지고, 특히 관상어에 대한 근본적인 조사가 뒤따라야 한다고 할 수 있다.
- 국내 국제 내성균문제에 대한 중요한 정보를 확립되었으므로 이것을 database화함으로서 우리나라 수산업 보호에 활용 할 수 있음
- 향후 내성균의 내성 수준 증가, 전이속도, 수입 이식어의 위험성, 그리고 새로운 내성 유전자 발생에 대한 경보 체계구축과 수산물 관리도 보다 과학적으로 접근 할 수 있게 할 것임

IV. 보안성 검토

○ 해당사항 없음

1. 연구책임자의 의견

○ 해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과