

이학석사 학위논문

*Edwardsiella tarda*의 quinolone
내성 유전자 Cloning과 특성 분석

이 논문을



학위논문으로 제출함.

2005년 2월

부경대학교 대학원

어 병 학 과

신 순 범

신순범의 이학석사 학위논문을 인준함.

2004년 12월 23일

주 심 이학박사

김 기 홍



위 원 농학박사

박 수 일



위 원 이학박사

정 현 도



목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험 관주	4
2. 약제 감수성 시험 및 nalidixic acid 내성균 분리	5
3. Total DNA 분리	6
4. DNA gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene 염기 서열 분석	7
4-1. Primer 제작 및 PCR	7
4-2. QRDR의 Upstream과 downstream 염기 서열 구명	12
4.2.1. Template DNA 준비	12
4.2.2. Cassette ligation-mediated PCR	12
4.3. Cloning	15
4.3.1. Gel elution	15
4.3.2. Cloning	15
4.3.3. Plasmid 분리	16
4.3.4. 염기 서열 분석	17
4.4. Mutant <i>E. coli</i> 에서의 <i>E. tarda</i> GyrA 발현 실험	18
4.4.1. Transformation	18
5. Quinolones 내성균의 mutation 특성 분석	19
6. Quinolones 내성 <i>E. tarda</i> 변이주 제작 (<i>In vitro</i>)	19

7. Mismatch amplification mutation assay PCR (MAMA PCR)	21
III. 결 과	23
1. Nalidixic acid 내성 균주의 분리	23
2. DNA Gyrase subunit A (<i>gyrA</i>) gene의 염기 서열 분석	25
2.1. <i>GyrA</i> genes의 QRDR 염기 서열 결정	25
2.2. QRDR의 upstream과 downstream 염기 서열 결정	27
2.3. <i>E. tarda gyrA</i> gene의 염기 서열 분석	31
2.4. <i>GyrA</i> mutant <i>E. coli</i> 에서 <i>E. tarda gyrA</i> gene의 발현 및 보상	36
3. Quinolones 내성균의 mutation 특성 분석	37
4. <i>In vitro</i> 변이주의 <i>gyrA</i> mutation 특성 분석	38
5. MAMA primer 제작 및 PCR	40
IV. 고 찰	43
V. 요 약	48
VI. 감사의 글	50
VII. 참고 문헌	51

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

Soon Bum Shin

*Department of Fish Pathology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Knowing the entire sequence of the DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene of *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) could be very useful for confirming the role of the *gyrA* subunit in quinolone resistance. Degenerate primers for the amplification of *gyrA* were designed by using consensus nucleotide sequences of *gyrA* 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* 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. 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*.

I. 서론

바이러스나 기생충 질병과 더불어 세균성 질병은 현재 어류 양식업에 심각한 경제적 손실을 입히고 있다. 세균성 질병은 그 원인균에 의한 일차적 감염 뿐만 아니라 바이러스나 기생충 그리고 기타 환경성 질병 후 2차적인 감염에 의해서도 많은 피해를 주고 있다.

Edwardsiella tarda (*E. tarda*)는 장내세균과에 속하는 그람 음성균으로 어류에서 에드워드증 (edwardsiellosis)의 원인균으로 담수나 해수 양식 산업에 막대한 손실을 일으키고 있다. *E. tarda*균은 산업상 중요 어종인 sea bream (Baxa et al., 1985), eel (Chen et al., 1996), flounder (Nakatsugawa et al., 1983), tilapia (Kubota et al., 1981), and striped bass (Herman and Bullock, 1986)뿐만 아니라 조류와 같은 척추동물, 파충류, 양서류 등의 광범위한 숙주 범위를 가지고 있다 (Janda and Abbott, 1993). 그리고 이 균에 감염된 어류는 그 어종에 따라 다양한 증상을 보이므로 육안적인 진단이 어렵고 치료에 있어서도 주의가 필요로 하게 된다.

*E. tarda*의 치료에 있어서는 과거 oxytetracycline (OTC)와 같은 tetracycline계 약물이 많이 사용되어 왔으나 최근 많은 아시아 국가에서는 tetracycline계 약물에 대한 내성균의 출현이 보고되었고 tetracyclines를 대신하는 약물로 quinolones가 사용되게 되었다 (Stock and Wiedemann, 2001; Aoki, 1988).

수산업에 사용되는 대표적 항생제로는 nalidixic acid (NA), oxolinic acid (OA), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP) 등이 있으며, 최근 들어 quinolone 계열 (특히 fluoroquinolone)항생제는 의학, 수의학 등 인간과 가축, 그리고 수산 양식

장에서 널리 사용되고 있으며, 가장 효과적인 약물 중 하나로 알려져 있다. 하지만 *E. tarda*를 포함한 세균성 질병의 치료에 quinolones가 널리 이용됨에 따라 질병에 걸린 어류로부터 이 항생제에 대한 내성균이 보고 및 연구가 되기 시작하였다 (Aoki, 1988).

Quinolone 항생제의 내성 기작은 크게 두 가지 원인으로 발생한다.

첫째는 DNA gyrase와 topoisomerase IV (Topo IV)를 암호화 하는 유전자의 변이에 기인하며, 두 번째는 세포막의 투과성 변화로 인해 항생제가 작용하지 못하게 되는 것이다. DNA gyrase, 즉 type II DNA topoisomerase는 DNA 복제시, DNA의 ATP-dependent negative supercoiling을 촉매하는 DNA 복제, 재조합, 전사에 필수적 효소로서 GyrA와 GyrB라는 소단위로 구성되어있다 (Hooper, 1998). Topo IV는 DNA decatenating 및 relaxing activity를 나타내고, 염색체 복제의 마지막 단계에서 염색체를 분리하는데 필수적인 성분으로 ParC와 ParE라는 소단위로 구성되어 있다 (Adams et al., 1992). Quinolones에 대한 내성은 이러한 유전자들의 변이에 의해서 획득되는데 이는 quinolone resistance-determining region (QRDR)이라 불리는 N-terminus의 특이적인 부위에서 대부분 발생하며, *E. coli*에서는 아미노산 배열 중 67~107번이 QRDR에 해당한다고 한다 (Nakamura, 1997; Horii et al., 2003). 그리고 *E. coli*를 비롯한 여러 균에서 QRDR의 83번 serine 과 87번 aspartate의 변이가 quinolone 내성 획득의 주요한 원인으로 알려져 있으며 (Drlica and Zhao, 1997; Capilla et al., 2004), 현재 *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Aeromonas salmonicida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni*를 비롯한 여러 균들의 *gyrA* gene 인기 서열이 밝혀져 있다 (Swanberg

and Wang, 1987; Dimri and Das, 1990; Oppegaard and Sorum, 1996). *E. coli*의 GyrA처럼 83번 아미노산 serine의 변이가 대부분 세균의 quinolone 내성균에서 발견되므로, GyrA가 많은 세균종에 있어 quinolone 내성의 첫 번째 target으로 생각된다 (Bébéar et al., 2000; Goni-Urriza et al., 2002). ParC, GyrB, ParE의 변이 또한 내성 획득에 다소 영향을 끼치는 것으로 보고되고 있으며, 일부 균에서의 염기 서열 역시 밝혀져 있다. *E. coli*를 포함하는 여러 그람 음성균에서 *gyrA*, *gyrB* gene은 각각 *parC*, *parE* gene과 상동성을 보이는 것으로 알려져 있으며 (Peng et al., 1993), 이들은 모두 chromosomal DNA상에 위치하나 *gyrA*와 *gyrB* gene은 다소 떨어져 있는 반면, *parC*와 *parE* gene은 가까운 곳에 위치한다고 알려져 있다 (Wang et al., 1993; Diane and Andrew, 1997).

이처럼 그람 음성이나 양성의 여러 균에서 quinolone 내성에 대한 연구가 이루어져 있는 반면 어병 세균에서는 그 연구가 아직 부족한 편이며 어병 세균의 하나인 *E. tarda*의 quinolone 내성에 대해서도 아직 보고된 적이 없었다.

그러므로 본 연구에서는 우리 나라 양어장의 병어로부터 분리한 *E. tarda*의 quinolone 내성 정도를 파악하고, *E. tarda*의 quinolone 내성 유전자인 *gyrA* gene의 염기 서열을 결정하고자 하였다. 그리고 quinolones 내성균에 있어 이 유전자의 변이를 관찰함으로써 quinolone 내성균이 가지는 분자생물학적인 특성을 구명하고자 하였다. 또한 *in vitro*에서 균을 quinolone 항생제에 인위적으로 노출시킴으로서 GyrA의 변이를 유도하여 변이 정도를 파악하고 분석하였으며, mismatch amplification mutation assay (MAMA) PCR를 실시하여 보다 편리한 방법으로 내성균의 GyrA의 변이 정도를 파악하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

1994년부터 2003년까지 우리 나라 양식장들의 병어로부터 분리한 *E. tarda* 균을 수집하여 각종 시험 약제에 대한 내성균을 찾고자 하였다. 시험에 사용된 균주는 Table 1과 같다.

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.

Table 1. *E. tarda* isolates used in this study

Strains	Area	Year
RED7	Yosu	1994
RED8	Yosu	1994
RE1	Kwangju	1995
RE7	Pohang	1995
RE8	Pohang	1995
LE2	Namhae	1995
LE3	Namhae	1995
JH4	Tongyoung	1996
CS	Kujedo	1997
DH	Kujedo	1997
KY	Kujedo	1997
RE12	Pohang	1998
RE23	Pohang	1998
JH9	Tongyoung	1999
JDE1	Yosu	2000
JDE2	Yosu	2000
JDE15	Tongyoung	2000
JDE21	Tongyoung	2000
JDE23	Namhae	2001
JDE27~JDE30	Namhae	2001
JDE31~JDE37	Kurtoungpo	2002
CJE1~CJE15	Jejudo	2003
CJE38~CJE45	Kujedo	2003

2. 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 Sigma사로 부터 구입하여 사용하였다.

채집 군주의 항생제에 대한 내성 정도는 Kim. (1997)에 따라 MIC (minimum inhibitory concentration) 값으로 나타내었으며, broth dilution method를 사용하여 측정하였다. 먼저 96 wells plate에 멸균된 TSB 160 μ l를 넣은 다음 각 농도로 희석된 항생제를 20 μ l씩 분주한 후 TSB에 10⁷cell/ml로 현탁시킨 균액을 20 μ l 넣었다. Positive control은 TSB 180 μ l에 희석시킨 균액 20 μ l를 넣고, negative control은 TSB만 200 μ l 넣었다. 이 well을 25℃에서 18시간 배양한 후 세균의 증식에 따른 액체배지의 혼탁도를 관찰하여 세균이 자라지 않는 항생제의 최저농도를 MIC 값으로 결정하였다.

Nalidixic acid 내성균은 phosphate-buffered saline (PBS)에 10⁵cell/ml의 농도로 희석한 후 60 μ l/ml nalidixic acid가 첨가된 TSA plate 에 접종하여 20개 이상의 집락을 형성하는 균을 선택하였다. 그리고 이러한 내성균은 quinolone 계열 항생제인 ofloxacin (OF)과 pefloxacin (PEF)에 대한 일부 약제 감수성 시험을 추가 실시하였다.

3. Total DNA 분리

TSB에 25℃ 또는 37℃, 24시간 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 취하여 12,000 rpm, 10분간 원심 분리하고, TE 완충액 (10mM Tris/Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 재현탁시킨 후 20% SDS와 20mg/ml의 proteinase K를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다.

위의 lysates에 5M의 sodium chloride (0.1 volume)을 첨가한 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)로 3회 추출하여 DNA가 녹아있는 용액층을 단백질 성분과 분리하였다. 위의 수용액층에 absolute ethanol (2 volume)을 첨가하여 DNA를 침전시키고, 원심 분리하여 생긴 침전물을 70% ethanol로 세척한 후 진공상태에서 건조시켜 증류수에 용해시켰다.

그 후 UV spectrophotometer로 260nm에서 흡광도를 측정한 다음 각각의 DNA 농도를 정량하여 실험에 사용하였다.

4. DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene 염기 서열 분석

실험균주는 채집균주 중 하나인 *E. tarda* GE1을 사용하였으며 유전자의 염기 서열 결정은 세 단계로 행하였다.

먼저 유전자의 QRDRs 서열을 결정하고, 그런 다음 이 서열의 flanking sequence를 찾아나갔으며, 마지막으로 전체 유전자의 염기 서열을 알고자 하였다.

4.1. Primer 제작 및 PCR

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 2).

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* (gene bank accession number respectively : X57174, L47978, X80798, X16817, U08817, AE006122, L29417, U56906, AB023569)의 *gyrA* gene의 가장 보존된 부위의 염기 서열로부터 다시 유추하였다 (Table 3, Fig. 1).

Table 2. Oligonucleotide primers used in the study (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)CACT)(ACG-3
VGYR2-S	Sense	GyrA, 57-62	5-AA(CT)GA(CT)TCGAA(CT)AA(AQ(GCC-3
VGYR3-S	Sense	ParC, 78-83	5-AA(AGTATCT)CA(CT)C(ACGT)CA(CT)G-3
VGYR4-S	Antisense	GyrA, 124-119; ParC, 127-122	5-T(ACGT)GT(AGTAT(ACGT)(CT)CAT(ACGT)CC-3
G1-S	Sense	GyrA, 21-28	5-TCGATTATCCGAT(CT)CC(CCGGT-3
G2-R	Antisense	GyrA, 127-120	5-GA(CT)ACCGT)(AG(CT)TTCGGTAAACG-3

^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 3. Oligonucleotide primers used in the determination of QRDR regions

Primer	Direction	Positions ^a	Base Sequence
DGYR-1	Sense	<i>gyrA</i> , 220-236; <i>parC</i> , 211-227	5-AT(GCCGGTAA(AGTA(CT)CAGCC-3
DGYR-2	Sense	<i>gyrA</i> , 316-332	5-CA(AAGCC(CT)AACTCC(CT)TC-3
DGYR-3	Antisense	<i>gyrA</i> , 536-517; <i>parC</i> , 511-530	5-GCCAT(AGCC(GTC)AC(GTC)CC(AQATACC-3
DGYR-4	Antisense	<i>gyrA</i> , 842-823	5-ACCAQA(TCT)CAQ(CAAGAT(CT)TT(CT)TC-3
DGYR-5	Antisense	<i>gyrA</i> , 1088-1069	5-GTAC(QAC(GTC)ACTTCAG(CCAAGCCGTC-3

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

		← DGYR-3	
A. salmonicida	488: TGCC-CA-ACCTGCTGCTCAACCGT--CATCC-GGTATCGCGGT-AGGTATGGC-ATGG	540	
E. carotovora	489: TCCC--A-ACCTGCTGCTTAACCGT-C-TT-CGGTATCGCAGTCGGG-ATGGCAA-CG	540	
E. coli	488: TTCC-TA-ACCTGCTGCTGAACCGT-C-TT-CGGTATCGCGGT-AGGTATGGCAA-CC	540	
K. pneumoniae	488: TCCC-GA-ACCTGCTGCTCAACCGT-CGTT--CGGTATCGCGGT-AGGTATGGCGA-CC	540	
N. gonorrhoeae	513: TCCC-CACA-CTGCTGCTCAACGGCT--CGTCC-GGTATCGCGGT-CGGTATGGCGA-CC	564	
P. aeruginosa	504: TTCC-CA-ACCTGCTGCTCAACCGT-CCA-GC-GGTATCGCGGT-CGGCATGGCGA-CC	556	
P. maltocida	521: T-CCCTGC-GCTTTAGTCAACGG-ITC--TTCCGGTATTCAGT-CGGTATGGC-AACT	573	
P. marcescens	488: TCCC-GA-ACCTGCTGCTCAACGGCT-C-GT-UGGGCATCGCGGT-GGGCATGGCTA-CC	540	
V. parahaemolyticus	489: T-CCAAAC--CTATTGCTCAACGG-TGC--TTCTGCTATCGCGGT-AGGTATGGC-AAAC	540	
		* * * * *	
		← DGYR-4	
A. salmonicida	793: CTGCCTTATC-AGGTGAACAAGGCG-CG-TTGATCGAGAAGATCGCC-GA---G--CT	842	
E. carotovora	790: ATCCCATATC-AGGTGAACAAGGCG--GCTGATCGAGAAAATTG-CGGA- ---GCT	839	
E. coli	790: ATTCGGTATC-AGSTAAACAAGGCG--GCTGATCGAGAAAGATTG-CGGA- ---ACT	839	
K. pneumoniae	790: ATTCGGTATC-AGSTGAACAAGGCG--GCTGATTGAGAAAATTCG-CTGA- ---GCT	839	
N. gonorrhoeae	817: ATCCCTATC-AGSTCAACAAGG-CAGG-TTGCTCGAGAAAATCGGC-GATTGCTTC-	871	
P. aeruginosa	809: CTGCGCTACC-AGTTGAACAAGGCG-CG-TTGATCGAGAAATCGCC-GA- ---G-CT	858	
P. maltocida	820: ATTCCTTATCAAG-TCAACAAGG-CAAAT-TAATCGAGAAAATTG-C- ---T-GATCT	869	
P. marcescens	790: ATCCCGTATC-AGSTGAACAAGGCG--GTCTGATCGAGAAATTCG-CGGA- ---GCT	839	
V. parahaemolyticus	787: ATTCCTTACCAAG-TGAACAAGGCTC--GTCTGATCGAGAAAGATTG-C- ---T-GAAT	836	
		* * * * *	
A. salmonicida	843: GGTCAAAAGAGAAGAA-G-GTCGAAGGCA---TCAGTGC---CCTGCG-CGA-TGAGTGC	891	
E. carotovora	840: GGTAAAGATAA--ACGTATCGAAGGCA---TTAGCGC---ACTGCG-TGA-CGAATCC	888	
E. coli	840: GGTAAAGAAAA--ACGCTGGAAGGCA---TCAGCGC---GCTGCG-TGA-CGAGTCT	888	
K. pneumoniae	840: GGTCAAAAGAAA--ACGCTGCAAGGCA---TCAGCGC---GCTGCG-TGA-CGAGTCT	888	
N. gonorrhoeae	877: GG-CAAA-A-AA-CA---CTGGAAGGCAT--TTCCGAGC--TCC-GCGACGA---A-TCC	915	
P. aeruginosa	859: GGTGAAAGAGAAGAA-G-ATCGAGGCTAT--TTCCGAG- ---CTGCG-CGA-CGAGTCT	907	
P. maltocida	870: GGTAAAGAGAAGAAAAG--TCGAAGGCAT--T-AGCGCAAT-C-ACG-GATTTA-TCT	918	
P. marcescens	840: GGTGAAAGAAAA--ACGCTGCAAGGCA---TCAGCGC---ACTGCG-CGA-CGAGTCC	888	
V. parahaemolyticus	837: TGTAAAGATAAGAAAG--TTGAAGGCATCAGT--GCSC--T---ACG-TGAAGAA-TCT	885	
		* * * * *	
		← DGYR-5	
A. salmonicida	1071: G--CAACCGCTGAGGTCTGACCCGCCGGA-C-CGTGT-TCG-A--GCTG--CGCAA	1118	
E. carotovora	1067: G--CCACCGCCCGGAAGTGGTGACCCGTCGTA-C-CATTT-TGAA---CTG--CGTAA	1115	
E. coli	1067: G--TCACCGCCGTGAAGTGGTGACCCGTCGTA-C-TATTT-TCGAA---CTG--CGTAA	1115	
K. pneumoniae	1067: G--CCACCGCCCGGAAGTGGTGACCCGCGTA-C-GATTT-PAGCA---CTG--CGTAA	1115	
N. gonorrhoeae	1094: G--CCACCGCCCGGAAGTGGTGACCCGACGTA-CGCTTT-CCG---GCTG-AAG-AA	1142	
P. aeruginosa	1088: ----CACCGCCCGAAGTGGTGACCCGCGTA-C-CGCT-ACG-A--GCTG--CGCAA	1134	
P. maltocida	1095: GTTACACCGTCGTGAAGTAGTCACACGCGTACGTT-T-TAT-GAATTGC-GCA---AA	1146	
P. marcescens	1067: G--CCACCGCCCGGAAGTGGTGACCCCGCA-C-CATCT-TCGAA---CTG--CGCAA	1115	
V. parahaemolyticus	1062: GGAT-CACCGTCGTGAAGTGGTGACCCGCGTA-C-TATCT-CCGAATTGC-GTA---AA	1113	

Fig. 1. Continued.

제작 과정에 있어 Primer DGYR-1와 DGYR-3은 *gyrA* gene 뿐만 아니라 *parC* 와도 보존되어 있었으며, DGYR-2, DGYR-4과 DGYR-5은 *gyrA* gene에만 특이적이었다.

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.

PCR은 200uM (each) deoxynucleoside triphosphates, bacterial total DNA 10ng, 각각의 primer 2 μ l, Gene *Taq* buffer (Perkin-Elmer, Germany) 5 μ l와 Gene *Taq* polymerase (Perkin-Elmer) 2.5U으로 구성된 50 μ l의 반응액에서 실시하였다. PCR 혼합물은 Perkin-Elmer 2400 thermal cyclor (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 thermocycling은 95 $^{\circ}$ C, 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 extention의 반응을 1 cycle로 하여 30 cycle을 반응시켰다. 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 post-extention 시켰다. PCR 후 생성된 cloning한 후 염기 서열을 확인 (결정)하였다.

4.2. QRDR의 Upstream과 downstream 염기 서열 구명

QRDR의 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.

4.2.1. 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, cassette ligation-mediated PCR의 template로 사용되었다. 이 실험에서 사용된 제한효소는 *EcoRI*, *PstI*, *SalI*, *XbaI*, *Sau3A I*이며, 각각의 제한효소가 처리된 DNA 혼합물을 준비하였다.

4.2.2. Cassette ligation-mediated PCR

4.1의 실험에서 결정된 623 bp의 염기 서열로부터 upstream의 염기 서열을 분석하기 위하여 GYRS1R과 GYRS2R primer를 제작하였다. 이는 *gyrA* gene의 5' end 방향으로 478에서 456 그리고 399에서 374 위치의 염기에 해당하며, 이 primer와 함께 C1과 C2 primer가 PCR에 이용되었다.

Cassette primer인 C1 과 C2 (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan) 는 각 cassette에 포함되는 염기 서열을 가지고 있으며 염기 서열은 다음과 같다.

C1 : (5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3')

C2 : (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3')

Cassette ligation-mediated PCR은 nested 방식으로 시행하였다.

First PCR은 400uM (each) deoxynucleoside triphosphates, template DNA (*EcoRI* cassette-ligated *E. tarda* DNA mixture) 500ng, C1 primer (10pmol/ μ l) 1 μ l, GYRS1R primer (10pmol/ μ l) 1 μ l, Takara LA PCR bufferII (Mg²⁺) 5 μ l와 Takara LA *Taq* polymerase 2.5U이 포함된 50 μ l reaction mix로 Perkin-Elmer 2400 thermal cycler 에서 실시하였다. PCR 혼합물은 94℃에서 10분간 predenaturation시킨 후, 94℃-30초, 55℃-30초, 72℃-30초간 반응을 1 cycle로 하여 30 cycle 반응시켰으며, 그 후 72℃에서 4분간 extention time을 주었다.

Second PCR은 400uM dNTP, first PCR product 1 μ l, C2 와 GYRS2R primer 각각 1 μ l, Takara LA PCR bufferII (Mg²⁺) 5 μ l와 Takara LA *Taq* polymerase 2.5U이 포함된 50 μ l reaction mix에서 실시되었으며, 특정 크기의 PCR product 가 생성되어 염기 서열이 분석되었으며, QRDR의 upstream 염기 서열이 결정되었다.

다음 QRDR의 downstream의 염기 서열을 분석하기 위하여 *Pst*I와 *Sal*I 처리 후 cassette가 ligation된 DNA template를 준비하였다. 그리고 새로 제작된 primers (GYRS1, GYRS2, GYRS3, GYRS4)를 이용하여 전 단계의 과정과 같이 PCR 후 염기 서열을 분석하였다.

이 방법으로 *EcoRI*, *PstI* and *Sall*에 해당하는 3개의 fragment가 생성되었고 cloning하여 *E. tarda* genome의 비지의 영역을 밝힐 수 있었으며, 전체 *gyrA* gene의 염기 서열을 결정하였다. 이 실험에 사용된 primer는 Table 4에 나타내고 있다.

Table 4. Primers used in cloning of *gyrA*

Name	Sequence (5' → 3')	Direction	Position	Object
DGYR-1	ATG(C)GGTAATTAC(T)CACCC	sense	220bp-236bp	Screening of <i>gyrA</i>
DGYR-4	ACCAGAT(C)TCA(G)GCA(G)ATC(T)TTC(T)TC	anti-sense	842bp-825bp	Screening of <i>gyrA</i>
GYRS1	TGCGCATGGCGAAGATTGCTCATGAG	sense	374bp-399bp	1 st 3' end walking ^a
GYRS2	CGGCATGAACAGATCCCGACG	sense	450bp-472bp	1 st 3' end walking ^a
GYRS1R	GCAGGACGTCGGGGATCTGTTCA	anti-sense	478bp-456bp	1 st 5' end walking ^a
GYRS2R	CTCATGAGCAATCTTCGCCATGCGCA	anti-sense	399bp-374bp	1 st 5' end walking ^a
GYRS3	ACATCGATCCGATCATTGAGCTGATC	sense	1166bp-1191bp	2 nd 3' end walking ^a
GYRS4	TCCGGAGTGGCTGGAGCCGAGTA	sense	1299bp-1322bp	2 nd 3' end walking ^a
SGYR-1	ATCAACTTGCCGAGGCCA	sense	1813bp-1831bp	Sequencing
SGYR-2	AGAACGGCTACGGCAAACGC	sense	2246bp-2265bp	Sequencing
SGYR-3	TCGACCAACGCTCAAGGT	sense	2860bp-2877bp	Sequencing
SGYR-4	TGTACATTGCCTCGCCG	sense	3468bp-3484bp	Sequencing
SGYR-5	CTGGCTGTTTGAACGCA	sense	3850bp-3866bp	Sequencing
GYRQ	GATGTCGGGATGGCCT	sense	106bp-122bp	Detection of <i>gyrA</i> QRDR
GYRQR	GCCAACAGCTCATGAGCAAT	anti-sense	407bp-388bp	Detection of <i>gyrA</i> QRDR
WGYRS	CGTAGGGCGACGGCTTCAAACCTG	sense	(-)298bp-(+)274bp	Cloning of Whole <i>gyrA</i>
WGYRR	AGACGAAGTATTCAACGTGGCGC	anti-sense	2855bp-2832bp	Cloning of Whole <i>gyrA</i>

^a Cassette ligation-mediated PCR.

4.3. Cloning

4.3.1. Gel elution

PCR 생성물을 , Pre-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 agarose로부터 분리·정제하였다. 먼저 전기영동으로 확인된 DNA가 포함된 gel의 band를 절단하여 새 microtube에 옮긴 후, binding buffer 500 μ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시켜 PCR 생성물이 들어 있는 gel을 녹였다. 그리고 matrix 15 μ l를 첨가하고, 실온에서 5분간 반응시킨 후, 12,000 rpm, 1분간 원심 분리하였다.

Gel 성분이 포함된 상정액을 모두 제거하고, 다시 binding buffer 375 μ l를 첨가하여, 같은 방법으로 원심 분리하고, 상정액을 제거하는 과정을 2회 거친 후, pellet을 실온에서 10분간 자연 건조시켰다. 건조된 침전물에 elution buffer 20 μ l를 첨가하여 현탁시킨 후, 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리 후, DNA가 녹아 있는 상정액을 새 microtube로 옮겨, 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다.

4.3.2. Cloning

정제한 DNA는 TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cloning하였다. 우선 정제한 DNA 4 μ l를 새 microtube에 옮긴 후, salt solution 1 μ l, distilled water 4 μ l, TOPO vector 1 μ l를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 그 뒤에 competent cell (*E. coli* DH5 α -T1^R OR) 50 μ l를 첨가하여 ice에서 20분간 반응시키고, 42°C에서 30초간 heat-shock을 주었다.

Heat-shock이 끝나고 즉시 ice에 2~3분간 옮겼다가 SOC 배지 250 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 진탕 배양하였다. 배양액은 X-Gal 40 μ g/ml, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB plate에 도말하여 24시간 배양하여 blue와 white colonies가 자라는 것을 관찰하였다.

4.3.3. Plasmid 분리

배양된 blue/white colonies 중에서 white colony를 취해, ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB broth에 접종한 뒤 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양하였다. 배양액 1.5ml을 microtube에 옮기고 12,000 rpm으로 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여 균을 침전시킨 후, 상정의 배지 성분을 제거하였다. 균 pellet에 100 μ l ice-cold solution I (50mM glucose, 25mM Tris/Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0)을 넣고, vortex 하여 완전히 현탁시켰다. 200 μ l의 solution II (0.2M NaOH, 1% SDS)를 넣고, 5번 상하를 뒤집으며 혼합한 뒤, ice에 5분간 반응시켰다. 그 뒤 150 μ l ice-cold solution III (60ml 5M potassium acetate, 11.5ml glacial acetic acid, 28.5ml distilled water)를 넣고 혼합한 후 ice에서 5분간 반응시켰다. 이 혼합액을 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상정액의 plasmid용액을 새 microtube에 옮겼다. Plasmid 용액과 동량으로 phenol/chloroform을 넣고, 혼합한 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 새 microtube에 옮겼다. 그리고 상정액 volume의 2배만큼 ethanol을 넣고, 0.3M sodium acetate를 첨가하여 위아래로 섞어주고 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 침전시켰다. 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 10분간 원심 분리하여, 상정액을 완전히 제거한 뒤, 10분간 상온에서 자연 건조시켰다.

다음으로 20 μ g/ml RNase가 첨가된 50 μ l TE-buffer를 DNA 침전물에 넣어 녹

인 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 현탁물에 2.5M NaCl이 첨가된 20% PEG8000 30 μ l를 넣어서 섞은 뒤, ice에서 90분간 반응시킨 후, 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 제거하고, 70% ethanol 100 μ l를 첨가하여 다시 같은 방법으로 원심 분리하여 상정액을 제거하고 plasmid DNA 침전물을 10분간 상온에서 자연 건조하였다. 건조 후 TE buffer 50 μ l에 현탁하여 염기 서열을 분석하는 데 사용하였다.

4.3.4. 염기 서열 분석

Big Dye Terminator Cycle DNA Sequencing Kit (ABI PRISM PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 분리된 plasmid내에 insertion된 염기 서열을 밝힌 후, 각각의 염기 서열은 MACAW program (Version 2.0.5., National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 비교하였다.

4.4. Mutant *E.coli*에서의 *E. tarda* GyrA 발현 실험

Table 4의 WGYRS/WGYRR primer set를 이용한 PCR로 *gyrA* gene의 전체 염기 서열을 증폭하고 vector에 cloning하였다. 이 plasmid를 temperature-sensitive *gyrA* mutant, *E. coli* KNK453 (Kreuzer and Cozzarelli, 1979)에 transformation시켰다.

4.4.1. Transformation

Calcium chloride 법을 이용하여 실시하였다 (Kim, 1993). *E. coli* KNK453을 5 ml LB배지에 접종하여 24시간 배양한 것을 접종량이 1%되도록 5ml LB배지에 다시 접종하여 OD₅₅₀에서 흡광도가 0.4~0.6이 될 때까지 2~3시간 배양한 다음 ice에 10분간 냉각시켰다. 1.5ml을 취하여 미리 냉각시킨 microtube에 옮긴 후 5,000 rpm, 5분간 원심 분리하여 상정액을 제거하고, 침전물에 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH 8.0)용액 750μl을 가한 다음 ice에서 15분간 냉각시켰다. 5,000 rpm, 5분 동안 원심 분리하여 침전물을 얻고, 여기에 다시 50mM CaCl₂ + 10mM Tris-Cl (pH 8.0)용액 100μl 넣은 후 4℃에서 12~24시간 방치하여 competent cell을 제조하였다.

Competent cell에 목적하는 plasmid DNA를 넣고 잘 섞어준 다음 ice에 30분간 방치한 후 42℃의 water bath로 옮겨 2분 동안 처리하였다. 그 다음 1ml의 SOC배지를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 배양시킨 후 ampicillin 50μg/ml이 들어 있는 LB agar에 200μl 도말하였다. 37℃와 42℃에 각각 12~24시간 배양 후 transformant를 선별하였다.

5. Quinolones 내성균의 mutation 특성 분석

앞에서 결정된 *gyrA* gene의 염기 서열을 바탕으로 mutation 특성을 분석하기 위하여 Table 4에서 설명된 primer (GYRQ, GYRQR)로 PCR 후, QRDR의 염기 서열을 확인하고 감수성을 보이는 균과 비교 분석하였다.

6. Quinolones 내성 *E. tarda* 변이주 제작 (In vitro)

실험 균주로는 *E. tarda* PPD 130/91 (Ling et al., 2000) 균주를 사용하였으며 항생제가 첨가된 Mueller Hinton (MH, Difco) agar 배지에 단계별로 실험하였다.

첫 번째 단계에서는 wild type의 균주를 MH broth에서 16~18시간 배양 후 각 plate당 MIC 농도의 1~16배의 nalidixic acid가 첨가된 MH plate에 도말하였다. colony를 보이는 최고 농도의 항생제 배지에서 균을 선택 분리하고 그 중 하나의 균주를 MH broth에 배양 후 다음 단계를 실시하였다. MH broth에서의 배양은 균이 충분히 활성을 가질 수 있도록 2~3회 계대배양을 하였으며, broth 배지는 agar에서의 균 선택 시 항생제 농도와 같은 농도의 항생제를 첨가하였다.

두 번째 단계부터는 MIC 농도의 2~32배의 ciprofloxacin이 첨가된 MH plate에 균을 도말하였으며 역시 최고농도의 항생제 배지에서 자란 colony를 선택 분리하였다. 실험에 사용된 모든 균은 OD₆₀₀에서의 흡광도를 측정하고, colony의 수를 counting하여 mutation frequency를 측정하였다 (Table 5).

그 후 단계별로 분리된 한에서 *gyrA* gene의 QRDR 염기 서열을 결정한 후 wild type 및 quinolone 내성균과 비교 분석하였다.

Table 5. Stepwise selection of quinolone resistant mutants

Step	No. of cells plated	Selecting agent ^b ($\mu\text{g/ml}$)	No. of colonies	Mutation frequency ^a
I	1.91×10^{11}	NA (16)	2	1.05×10^{-11}
	2.77×10^{11}	NA (16)	7	2.53×10^{-11}
II	1.13×10^{11}	CIP (0.06)	242	2.14×10^{-9}
III	1.57×10^{11}	CIP (0.2)	110	0.70×10^{-9}
	1.55×10^{11}	CIP (0.2)	224	1.45×10^{-9}
IV	1.53×10^{11}	CIP (1)	29	1.89×10^{-9}
V	1.42×10^9	CIP (4)	7	4.93×10^{-9}
		CIP (6)	6	4.22×10^{-9}
VI	1.30×10^{11}	CIP (16)	230	1.77×10^{-9}

^a The mutation frequencies were calculated by dividing the number of CFU per milliliter selected on agar plates containing the respective selecting agent in the concentration indicated by number of CFU per milliliter plated in total.

^b NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

7. Mismatch amplification mutation assay PCR (MAMA PCR)

Wild type의 *gyrA* gene의 염기 서열과 비교하여 하나의 염기를 mismatch시킨 reverse primer를 제작하였다 (Qiang et al., 2002). 83번째 아미노산은 그 염기가 감수성균은 AGC이지만 대부분의 내성균에서는 CGC나 AGA로 변한다는 것을 앞의 실험 결과 확인하였다. 이를 이용하여 primer의 염기를 TCG로 하고 그 다음에 오는 염기를 하나 바꾸어 reverse primer를 제작하였다 (Fig. 2). 이렇게 제작된 primer는 83번 아미노산의 염기가 AGC인 감수성 균은 염기가 하나만 바뀌어 있으므로 PCR 결과 그 primer에 상응하는 product를 형성하고 CGC나 AGA로 그 염기의 변이가 있는 내성균들은 결국 2개의 염기가 바뀌어 있어 product를 형성하지 않게 된다. 87번 아미노산 염기의 변이는 GAC에서 GGC로의 변이가 관찰되었으며 primer는 GAC 바로 다음의 염기인 A를 T로 바꾸어 주고, 87번 아미노산의 염기인 GAC 중 AC에 상보적인 TC의 염기를 가지게 제작하였다 (Fig. 2). PCR은 Table 3의 WGYRS와 GYRS1 그리고 여기서 제작된 각각의 MAMA primer를 함께 사용하였으며, annealing 온도를 59℃로 조절하여 실시하였다.

실험 결과 예상되는 PCR product의 특징은 다음과 같다. 우선, 유전자 내에 변이가 없는 감수성균은 WGYRS, GYRS1과 MAMAGYRA83 또는 MAMAGYRA87의 primer로 PCR 했을 경우 각각 776 bp, 484 bp 또는 776 bp, 497 bp의 두 개의 product를 증폭 할 것이다. 하지만 83번이나 87번의 아미노산에 변이를 보이는 quinolone 내성균은 MAMA primer가 작용하지 못하여, WGYRS와 GYRS1의 생성물인 776 bp의 product만을 증폭할 것이다.

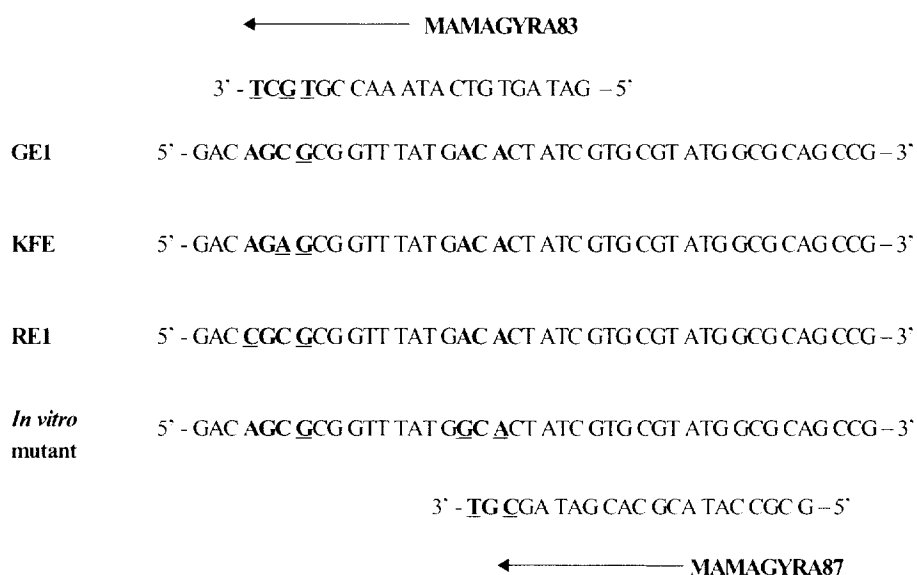


Fig. 2. Comparison of DNA sequence around the codons for amino acids of insult in GyrA in quinolone susceptible and resistant isolates.

III. 결과

1. Nalidixic acid 내성 균주의 분리

1994~2003년까지 우리 나라 양식장에서 분리한 *E. tarda* 중 다수가 nalidixic acid에 내성을 보이는 것을 알 수 있었다. 이러한 내성을 보이는 균주는 총 136 균주 중 52균주로 38%로 나타났으며 이들은 nalidixic acid 뿐만 아니라 다른 quinolones에도 다양한 내성치를 보였다 (Table 6).

Quinolone 내성 획득에 있어 plasmid와의 관계를 알아보기 위해 몇몇의 채집 균을 선택하여 plasmid를 분리한 후, transformation 실험을 실시하였다. 결과 test된 모든 *E. tarda*는 plasmid를 가지고 있지 않아 transformation이 되지 않거나, transformation후 분리된 plasmid는 *gyrA* gene을 가지고 있지 않았다. 그러므로 quinolone의 내성에는 plasmid가 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Table 6. Quinolone resistant isolates in Korea

Name	Resistance(after 1day)					
	NA	OA	NOR	CIP	AMP	TC
RED7	> 480	2	0.31	0.08	2.5	-
RED8	≥ 480	1	0.31	0.08	5	-
RE1	60	0.5	0.08	0.04	10	15
RE7	≥ 480	4	0.31	0.08	2.5	-
RE8	≥ 480	4	0.31	0.08	10	-
LE2	≥ 480	2	0.31	0.16	125	-
LE3	240	1	0.63	0.08	0.63	-
JH4	≥ 480	1	0.16	0.08	2.5	-
CS	60	0.5	0.31	0.08	5	0.94
DH	120	1	0.63	0.08	5	0.94
KY	240	1	0.63	0.08	5	0.94
RE12	≥ 480	4	0.31	0.08	-	-
RE23	60	0.5	0.08	0.04	2.5	30
JH9	≥ 480	2	0.16	0.08	5	-
JDE1	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE2	240	1	0.63	0.08	10	-
JDE15	240	1	0.63	0.08	5	30
JDE21	240	0.5	0.31	0.08	5	-
JDE23	240	1	0.63	0.08	10	0.94
JDE27	240	1	1.25	0.08	10	15
JDE28	240	1	1.25	0.08	5	30
JDE29	240	1	1.25	0.08	10	30
JDE30	240	1	1.25	0.08	5	60
JDE31	240	1	1.25	0.08	5	60
JDE32	≥ 60	2	1.25	0.31	20	60
JDE33	≥ 60	2	1.25	0.31	20	30
JDE34	> 60	2	1.25	0.31	10	≥60
JDE36	≥ 60	4	-	0.63	20	30
JDE37	≥ 60	4	1.25	0.63	20	≥60
CJE1	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE2	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE3	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE4	240	2	0.03	0.13	8	32
CJE5	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE6	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE7	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE8	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE9	240	2	0.03	0.13	8	8
CJE10	60	1	0.03	0.13	≥1024	512
CJE11	240	2	0.03	0.13	8	16
CJE12	240	1	0.03	0.13	8	16
CJE13	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
CJE14	60	1	0.06	0.06	≥1024	256
CJE15	≥ 480	2	0.5	0.25	8	256
JDE38	≥ 480	2	0.13	0.06	8	16
JDE39	≥ 480	2	0.25	0.13	8	16
JDE40	240	2	0.25	0.13	8	32
JDE41	≥ 480	2	0.5	0.25	8	128
JDE42	≥ 480	2	0.25	0.25	8	128
JDE43	240	2	0.13	0.25	8	128
JDE44	> 480	2	0.5	0.25	16	128
JDE45	≥ 480	4	0.5	0.13	8	16

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

2. DNA Gyrase subunit A (*gyrA*) gene의 염기 서열 분석

2.1. *GyrA* gene의 QRDR 염기 서열 결정

Nucleotide 수준에서 제작한 primer (Table 3)를 이용하여 *E. tarda* genomic DNA에 PCR 증폭을 실시한 결과를 Fig. 3에 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, 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.

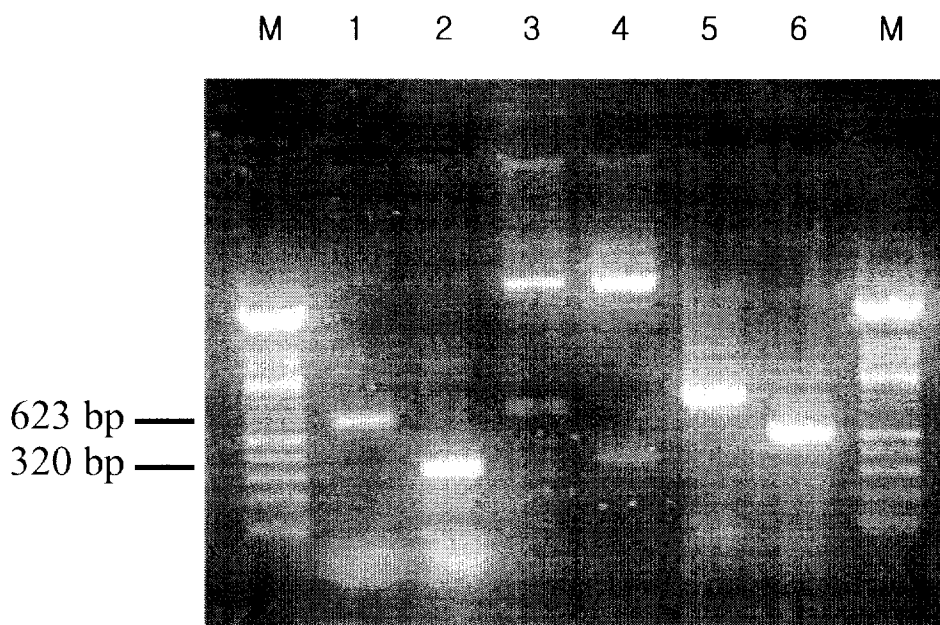


Fig. 3. Electrophoretic analysis of PCR products obtained by the amplification of *gyrA* and *parC* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *gyrA* (623 bp); lane 2, *parC* (320 bp); lane 3, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert 623 bp); lane 4, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (insert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

2.2. QRDR의 upstream과 downstream 염기 서열 결정

QRDRs region의 염기 서열이 결정된 후, QRDR의 upstream과 downstream sequence가 결정되었다.

우선 QRDR의 upstream sequence에서 *EcoR* I digest에서 721 bp의 PCR product가 생성되었다. Downstream sequence에서는 첫 단계로 제한효소 중 *Pst* I digest에서 943 bp의 PCR 산물을 생성되어 염기 서열이 결정되었다. *Pst* I fragment의 염기 서열을 가지고 primer (GYRS3, GYRS4)를 제작하여 PCR한 결과 *Sal* I digest에서 2885 bp의 PCR product를 얻을 수 있었다 (Fig. 4). 각각의 PCR 생성물은 cloning되어 염기 서열이 결정되었으며, *gyrA* gene의 전체 염기 서열이 결정되었다.

또한 본 연구의 결과물이 *gyrA* gene에서 증폭되었는지를 확인하기 위해 QRDR 부위와 전체 gene을 nucleotide와 deduced amino acid 서열로 지금까지 보고된 다른 세균 종의 *gyrA*, *parC*과 비교하였다. 결과 *gyrA* gene은 그람 음성균의 *gyrA* gene과 매우 높은 상동성을 나타내었다 (Table 7, Fig. 5).

320 bp의 *parC* gene 역시 다른 균과의 상동성을 비교한 결과 *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Serratia marcescens*에 각각 81, 84, 83, 82, 72, 43, 87%의 높은 상동성을 보였다.

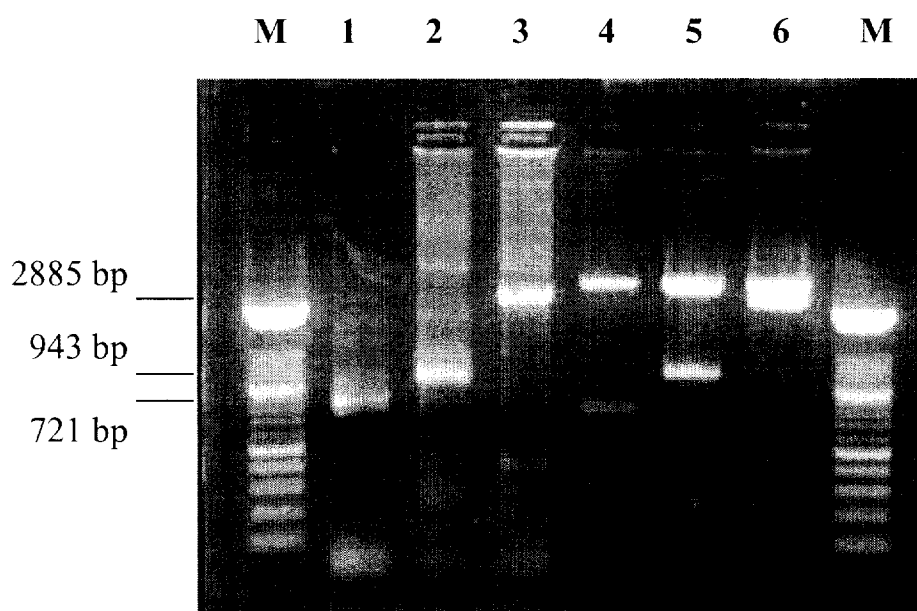


Fig. 4. Electrophoretic analysis of LA PCR products obtained by the amplification of upstream and downstream of *gyrA* QRDR regions in *E. tarda*. Lane 1, *EcoRI* digest (second PCR, 721 bp); lane 2, *PstI* digest (second PCR, 943 bp); lane 3, *Sal I* digest (second PCR, 2885 bp); lane 4~6, pCR 2.1-TOPO vector digested with *EcoRI* (lane 1, 2, 3, respectively). Lane M, DNA marker (100 bp ladder).

Table 7. Identity of the nucleotide and deduced amino acid sequence of the *gyrA* in *E. tarda* compared with those in other bacterial strains

	Organisms	Accession number ^a	Nucleotide sequence		Deduced amino acid sequence	
			Whole <i>gyrA</i>	QRDR	Whole <i>gyrA</i>	QRDR
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	X57174	78(49) ^b	84	85(30)	100
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	L47978	71	83	71	93
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	X80798	78	83	85	97
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X16817	80	84	86	97
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	U08817	59(49)	77	51(29)	85
	<i>Pasteurella multocida</i>	AE006122	64	88	72	95
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L29417	68(52)	78	63(32)	97
	<i>Serratia marcescens</i>	U56906	83(53)	91	86(31)	100
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AB023569	70(50)	85	77(31)	100
Gram (+)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AY157689	52(49)	65	46(34)	68
	<i>Campylobacter jejuni</i>	LO4566	48	63	45	70
	<i>Mycoplasma hominis</i>	U59880	45	65	39	75

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

^b The numbers in parentheses indicate the identity to *parC* gene.

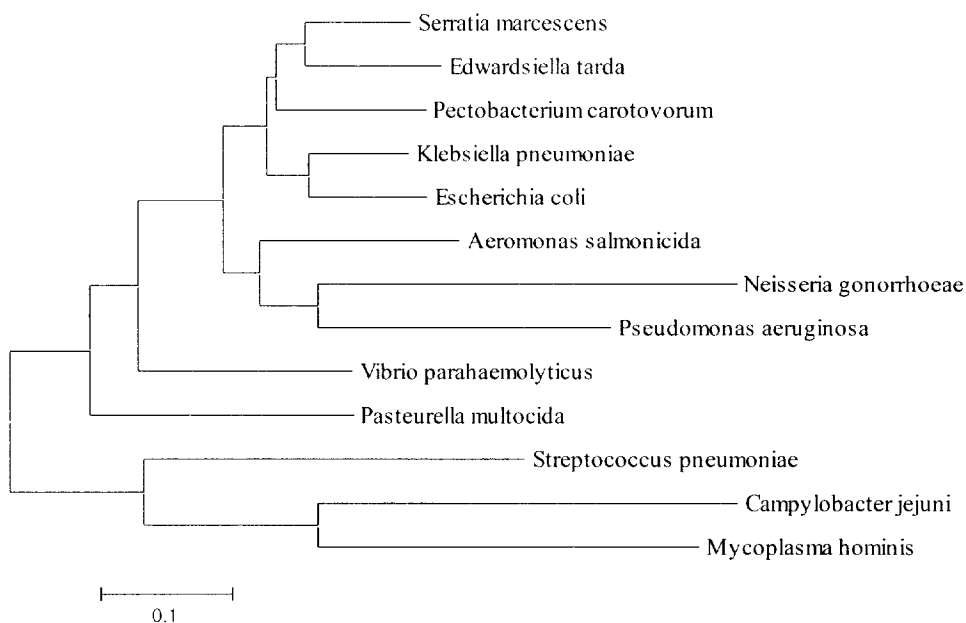


Fig. 5. Phylogenetic tree showing the relationship between the *E. tarda* *gyrA* gene with other known *gyrA* sequences. The accession numbers of the *gyrA* sequence are as follows: *Serratia marcescens*, U56906; *Pectobacterium carotovorum*, X80798; *Klebsiella pneumoniae*, X16817; *Escherichia coli*, X57174; *Aeromonas salmonicida*, L47978; *Neisseria gonorrhoeae*, U08817; *Pseudomonas aeruginosa*, L29417; *Vibrio parahaemolyticus*, AB023569; *Pasteurella multocida*, AE006122; *Streptococcus pneumoniae*, AY157689; *Campylobacter jejuni*, L04566; *Mycoplasma hominis*, U59880.

2.3. *E. tarda* *gyrA* gene의 염기 서열 분석

Complete gene을 분석한 결과 *gyrA* gene은 878개의 아미노산을 암호화하는 ORF (open reading frame)을 가지고 있었다 (Fig. 6, 7). ATG start codon으로부터 16 bp 앞쪽으로 *E. coli*의 Shine-Dalgarno consensus sequence (GAGGG)와 유사한 ribosome-binding site가 나타났으며 이 site는 ribosome 30S subunit의 16S rRNA와 결합하여 단백질 생합성 개시에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. ribosome-binding site의 8 bp 앞에는 *E. coli*의 -10 promoter (TATAAT)와는 다소 차이가 있지만 *A. salmonicida*의 -10 promoter와는 같은 TAATTA의 염기가 나타났다. 더 앞쪽으로 정확하지는 않지만 *H. pylori*의 -35 promoter (TTGATT) (Moore et al., 1995)와 유사한 TGTATT 염기를 관찰할 수 있었다. 하지만 *E. coli*, (Swanberg and Wang, 1987), *K. pneumoniae* (Dimri and Das, 1990)와 *Bacillus subtilis* (Moriya et al., 1985)의 -35 promoter (GTTACC)나 ATTTTCC (*Serratia marcescens*), GTTTGCC (*P. aeruginosa*), GTTTCCC (*E. carotovora*), GTTTAAG (*A. salmonicida*)와 같은 염기는 관찰할 수 없었다 (Kim et al., 1998; Kureishi et al., 1994; Rosanas et al., 1995; Oppegaard et al., 1996).

E. tarda *gyrA* gene의 앞 쪽으로 전사 과정 중 십자형의 구조를 형성하는 inverted repeated sequence 또한 2쌍이 발견되었다. 이들은 ATG start codon의 앞 쪽으로 -203/-85 위치에 해당하는 AAAGAC/GTCTTT와 -199/-16 위치의 ACCCTC/GAGGGT의 염기로 각각 118과 183의 염기의 unpaired loop를 가지는 십자형의 구조를 형성하게 된다.

이들 inverted repeated sequences의 존재는 *E. coli* (Horowitz and Loeb,

1988)에서 추측할 수 있듯이 *gyrA* 전사의 supercoiling dependent regulation이 *E. tarda*에서도 일어남을 나타내며 이는 *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*의 *gyrA* promoter에서도 증명되었다 (Oppegaard et al., 1996; Kureishi et al., 1994; Dimri and Das, 1990). 또 한 쌍의 inverted repeated sequence인 AAGGGC/GCCCTT 가 TAA stop codon의 뒤 46/63 위치에 나타났으며 이는 17개의 unpaired loop을 형성함으로써 전사의 종료 신호로써 작용하고 알려져 있다 (Oppegaard et al., 1996).

이 실험 결과 *gyrA* gene에 해당하는 ORF이외에 또 다른 ORF가 발견되었는데 이는 *gyrA* gene의 3' end 방향으로 *E. coli*의 RCSC gene과 49% 일치함을 알 수 있었다.

E. tarda GyrA의 아미노산 서열을 비교한 결과 *E. coli* 보다 3개의 아미노산 잔기를 더 가지고 있었으나, *C. jejuni*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* 등에서 발견되는 intragenic stretches (유전자내의 연속)는 없었으며, *E. coli*등의 다른 세균 (Horowitz and Wang, 1987)에서와 같이 DNA 손상이나 재결합에 관계하는 catalytic Tyr-122 또한 발견할 수 있었다.

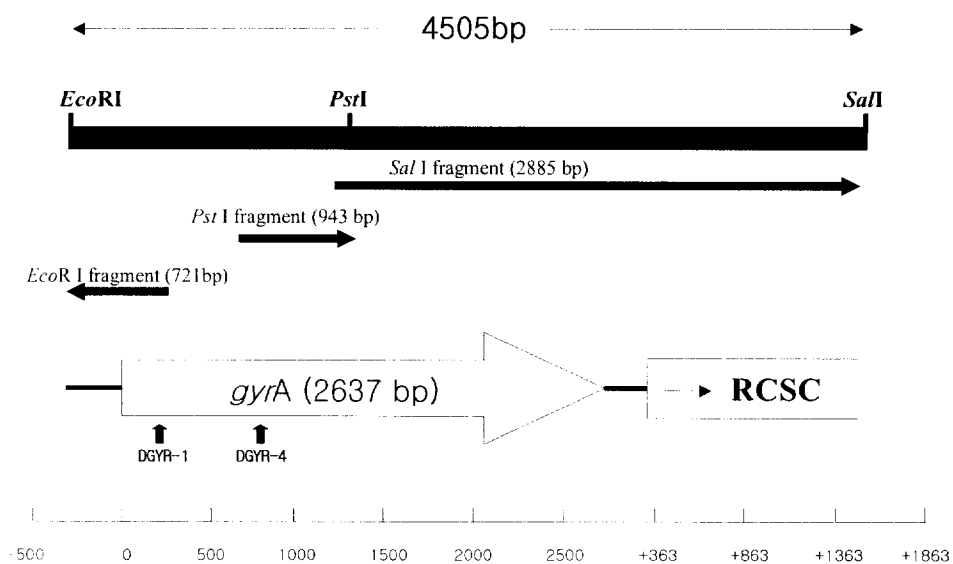


Fig. 6. Restriction map and organization of the *E. tarda gyrA* locus. Vertical arrows indicate positions of the degenerated primers (DGAR-1 and DGAR-4) used for the cloning of *gyrA* gene. Thick horizontal arrows indicate the produced DNA fragment with the used restriction enzyme and the walking direction.


```

>>>>>
1 TTTCTTCAAGATCAACGTTTGTGACACCTCTGACTCTTTAATCCAGCGCGCGGCGCGCAAAAAAGACCTCTGACGCGATTATA 270
>>>>>

CCCGTTGTTCCGCGATGGCAAAGGGGAGTCGGCGCTAAGGCTACGATGGCGGTGTGCAATTCGCAACAACCCCGGCCITGTGGTATCAT --180

<<<<<<
TATCGTCTTTGTCATCGTGTATGCGCCTGGTTCTACTCGATGATTGAGGGTAGCGGCAGATGAATAATTAGTAGAGGGATACGAGCTCC -90
<<<<<<

ATGAGCGACCTTCCAGAGAGATTACGCCGCTCAATATCGAAGAGAGTTGAAAACTCATATCTGGATTACGCCATGCTCGTTATCGTC 90
M S D L A R E I T P V N I E E E L K N S Y L D Y A M S V I V

GGTGTGCGGCTGCCGATGTTCCGGATGGCTGAAGCCGTACACCGTCCGCTGCTTTTGGGATGAACGTAAGTGGGCAATGACTGGAAC 180
G R A L P D V R D G L K P V H R R V L F A M N V L G N D W N

AAACCATACAAAAATCGGCCCTGTGGTCCGTGACGTTATCGGTAAATATCACCACACCGGTGACAGCGGGTTTATGACACTATCGTG 270
K P Y K K S A R V V G D V I G K Y H P H G D S A V Y D T I V
          DGYSR-1 →
          ATCGGTAAATATCACCAC

CGTATGGCGCAGCGTTCTCCCTGCGCTATATGCTGGTCGACGGCCACGGGTAACCTTGGCTCCATCGACGGCGACTCCGCGCGCGGATG 360
R M A Q P F S L R Y M L V D G Q G N F G S I D G D S A A A M

CGTTACACCGAAGTCCGATGCGCAAGATTGCTATGAC ← DGYSR2 ← DGYSR1 →
R Y T E V R M A K I A H E L L A D L O K E T V D Y V P N Y D

GYRS2 → ← GYRS1R
GGTACTGAACAGATCCCGGACGTTCTGCGGACCAAGGTGCCAACCTGCTGGTCAACGGCTCTGCCGATTCGCGGTGGGATGGCGACC 540
G T E Q I P D V L P T K V P N L L V N G S A G I A V G M A T

AACATCTCTCCCATACCTGACCGAGGTGATCAACGGCTGCCTGACCTATATCGATGATGAGAACATCACCATCGAAGGGCTGATGGAG 630
N I P P H N L T E V I N G C L A Y I D D E N I T I E G L M E

CATATCCCGGGCGGCACTTCCCGACGGCGCGATCATCAACGGCGCGCGCATTGAAGAGGCTTACCGTACTGGCGCGCGCAAGATC 720
H I P G P D F P T A A I I N G R R G I E E A Y R T G R G K I

TACGTGCGGCGCGCGCGAGATCGAGTTGACGATAAAATGGCCGCAAAACCATCGTGGTGCATGAGATCCCTATCAGGTCAACAAG 810
Y V R A R A E I E V D D K N G R E T I V V H E I P Y Q V N K

GCGCGTCTGATCAGAAAATGCGCGAGTGGTGAAGAGAGAAGCGGTCGAGGCGATCAGCGCCCTGCGCGATGAGTCCGATAAGAGCGGG 900
A R L I E K I A E L V K E K R V E G I S A L R D E S D K D G
          DGYSR-4 ←
          GAGAAAATGCGCGAGTGGT

ATGCGCATCGTTATCGAAGTCAAGCGGACGCGGTGGGCGAGGTGTGCTGAATAACCTCTACACCCAGAGCAGATGCAGGTCTCTCTTC 990
M R I V I E V K R D A V G R G V L N N L Y T Q T Q M Q V S F

GGTATCAACATGGTGGCGTTGCACCGAGGACAGCCGAAGCTGCTTGACCTGAAAGAGTGCCTGGAAGCCTTTGTGGCCACCGCGGTGAG 1080
G I N M V A L H Q G Q P K L L D L K E C L E A F V R H R E

GTAGTGACCGCGCGACCATCTTTGAAGTGGCAAGCGCGAGCGTGCCACATATTGGAAGGCGCTGGCCATTGCGCTGGTCAACATCG 1170
V V T R R T I F E L R K A R E R A H I L E G L A I A L V N I
          GYRS3 →
          GATCGATCATGACCTGATC

GATCGGATCATGACCTGATCGCGGTGCGCGACGCGCGCGAGGCCAAGGCTGCGCTGGTTCCCAAGCCTGGGCGCTGGGCAACGTG 1260
D P I I E L I R R A P T P A E A K A A L V S Q A W A L G N V

```

Fig. 7. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *E. tarda gyrA* 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 stop codon (boxed) respectively also shown.

GYS4 

GGGCGATGCTGGCAGCGCGCGCGGAGGACGCGCGCTCCGGAGTGGCTGGAGCGCGASTAGGCATTCCGACGCGCCATTATCACCTG 1350
A A M L A R A G D D A A R P E W L E P C Y G : R D G H Y H L

ps1

ACGGAGCAGCAGGCGCAGCCGATCCTGGATCTGCGCTCGCAGAACCTGACCGCGCTGGAGCACGAGAAGCTGCTGGATGAGTACAGGCG 1440
T E Q Q A Q A I L D L R L Q K L T G L E H E K L L D E Y K A

CTGTAGAGCAGATCGCGCGCTGATCTTCATCCTGCAGAGCCGGAGCGCTGATGGAGGTGATCCGCGAAGAGCTGATCGCCATCGCG 1530
L L E Q I A A L I F I L Q S P E R L M E V I R E E L I A I R

GAGCAGTTTGGCGATCGCGCGCACCGAGATCACCGCCAACACGGCGGATATCAATATCGAAGATCTGATCGAGCAGGAAGCGTGGT 1620
E Q F G D A R R T E I T A N T A D ! N I E D L I E Q E D V V

GTGACCGTGTGCGATCAGGGCTACGTGAAGTACCAACCGGTGAGCGACTATGAGGCTCAGCGTCGCGGCGGTAAAGGTAACTCGCGCGG 1710
V T L S H Q G Y V K Y Q P L S D Y E A Q R R G G K G K S A A

CGAATTAAGAGAGGACCTTATCGATCGGCTGCTGGTGGCAATACCCACGACAGATCCTGTGCTTCTTCAGCGGGGCGCGATGATC 1800
R I K E E D L I D R L L V A N T H D T I L C F F S R G R M Y

TGATGAAGATGATCAACTTGGCGAGCCAGCGCGGTGCCGCGGTGTCGCGATCATCAACTGCTGCGCGTGGAGGCGGACGAGCGC 1890
W M K M Y Q L A G A S R G A R G R P I I N L L P L E A D E R

ATCACCGCTATCCTGCGGTGCGTGAGTATGCCGAAGGGTCAACGTGTTTATGGCGACCGCCAGCGGTACGGTGAAGAAGACGCGCGTG 1980
I T A I L P V R E Y A E G V N V F M A T A S G T V K K T A L

ACCGAGTTCAGCGCTCCGCGCGCGCGGGATTATCGCGTGAACCCCACTACGCGGATGAGCTGATCGGGTGCATCTGACCGATGCG 2070
T E F S R P R A A G I ! A V N P N Y G D E L I G V D L T D G

AACGACAGGATGCTGTCTCGTCCGCGTAAAGTGGTGGCTTCAGGAGGACGCGGTGCGTCCATGGGCGTACCGGACCGGG 2160
N D E V M L F S V A G K V V R F K E D A V R A M G R T A T G

GTGCGAGGCATCAAGCTGGCGGAGAGGATCGCGTGGTATCGCTGATCGTACCGCACGCGGAAGGCGCTATCCTGACCGTGACCGAGAAC 2250
V R G I K L A G E D R V V S L I V P H G E G A I L T V T Q N

GGCTACGGCAACGCGCGCGGTGGCGAGTATCCGACCAAGTCACGCGGACCCAGGGGGTTATCTCCATCAAGGTGACCGAGCGTAAC 2340
G Y G K R S G V A E Y P T K S R A T Q G V I S I K V T E R N

GGCAGCGTGTGCGCGCGTGCAGGTGAGGACTGCGACCATCATGATGATCACCGATGCGCGTACCGTGGTGGCAGCCGAGTATCC 2430
G S V V G A V Q V E D C D Q I M M I T D A G T L V R T R V S

GAGGTGAGCATGCTCGGGTGTAAATACGAGGGGGTTATCCTGATCCGTACCGCGAAGACGAGCACGTGGTGGGCTGCAGCGGGTGGT 2520
E V S I V G C N T Q G V I L I R T A E D E H V V G L Q R V V

GAGCGGGTTGACGACGAAGATCTGGACAGCATCGACGCGAGCGCGGAGGGTGACGATGAGATCGTGGCGGAAGTGAGAGCGATGAC 2610
E P V D D E D L D S I C G S A A E G D D E I V P E V E S D D

GATGCGCGGAGGACGCGCGGAATTAAGGCGATGACGATGCGCGCGAGGACGCGGAATAAGCGTGGACGCGGGTACAGAGGGCC +53
D A A E D D A E >>>>>>

GGTTACTCGGCGCTTTTTTATGCGCGTGAGTGGCGGCTATCGGTTGACGCGCTGATGCGCGCGCGGCTGAATGCGCTGACGCGC +143
<<<<<<

Fig. 7. – Continued.

2.4. *GyrA* mutant *E. coli*에서 *E. tarda gyrA* gene의 발현 및 보상

E. coli KNK 453균주는 temperature-sensitive *gyrA* mutant로 43℃ 이상에서는 *gyrA* gene이 기능을 잃어 균이 자라지 않게 된다. 이 실험에서는 *E. tarda gyrA* gene을 포함하고 있는 plasmid를 transformation시킴으로써 *E. tarda gyrA* gene의 *E. coli*에서의 보상 여부를 관찰하였다. 실험 결과 transformation된 *E. coli*는 30℃뿐만 아니라 43℃에서도 그 균이 자라는 것이 관찰되었고, 이와는 대조적으로 control인 TOPO vector만을 transformation 시킨 KNK 453균주는 43℃에서는 자라지 않는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 8).

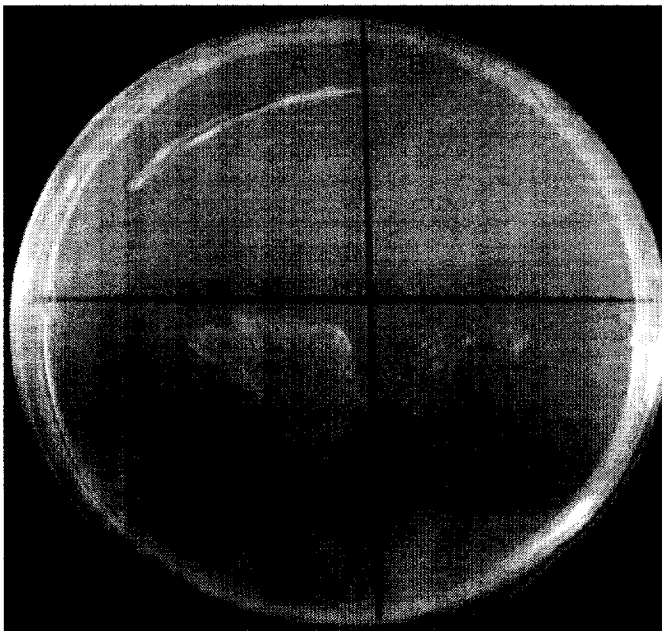


Fig. 8. Agar plate growth at 43℃ of *E. coli* KNK453 transformed with the following: untransformed (A), Topo vector (B), Topo vector (Inserted *E. coli gyrA*) (C), TOPO vector (Inserted *E. tarda gyrA*) (D).

3. Quinolones 내성균의 mutation 특성 분석

실험에서 분리된 nalidixic acid 내성균 중 일부 균을 임의적으로 선택하였다. 앞에서 결정된 *gyrA* gene의 염기 서열을 바탕으로 QRDR의 염기 서열을 분석함으로써 내성 획득과 gene의 mutation 특성을 분석하였다. 결과 선택된 모든 균주에서 GyrA의 83번 아미노산이 전체적으로 변한 것을 관찰할 수 있었다 (Table 8). 선택된 모든 균은 83번 아미노산인 serine이 arginine으로 변이가 일어난 것을 알 수 있었으며 nucleotide는 AGC가 AGA나 CAC로 변한 것을 확인할 수 있었다.

Table 8. Susceptibility to quinolones and mutations in the QRDR of *gyrA* genes of *E. tarda* isolates

Strain	Isolation	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a				Mutation in <i>gyrA</i>	
		NA	OA	NOR	CIP	amino acid	base change
GE1	1994, Kujedo	2	0.13	0.03	0.008	S3(Ser)	AGC
RED7	1994, Yosu	≥ 512	2	0.31	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
RE1	1995, Kwangju	64	0.5	0.08	0.03	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	CAC
RE8	1995, Pohang	≥ 512	4	0.31	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
LE2	1995, Namhae	≥ 512	2	0.31	0.13	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JH4	1996, Tongyoung	≥ 512	1	0.16	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
KFE	1997, Gampo	64	2	0.13	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JH9	1999, Tongyoung	≥ 512	2	0.16	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JDE2	2000, Yosu	256	1	0.63	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JDE30	2001, Namhae	256	1	1.25	0.06	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JDE37	2002, Kuryongpo	≥ 512	4	1.25	1.25	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
CJE13	2003, Jeju	≥ 512	2	0.5	0.25	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA
JDE45	2003, Kujedo	≥ 512	4	0.5	0.13	S3(Ser $\rightarrow$ Arg)	AGA

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

4. *In vitro* 변이주의 *gyrA* mutation 특성 분석

Wild type의 *E. tarda*는 nalidixic acid 및 ciprofloxacin에 총 6단계를 거쳐 내성이 유도되었으며 많은 수의 mutant를 분리할 수 있었다 (Fig. 9).

항생제가 첨가된 MH agar에서 단계별로 선택된 균들은 MIC test 및 QRDR의 염기 서열이 분석되었고 모든 단계의 변이주들이 GyrA의 87번 아미노산이 Asp에서 Gly로의 변이를 보임을 알 수 있었다 (Table 9).

Table 9. Characteristics of quinolone-selected mutants of *E. tarda*

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

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

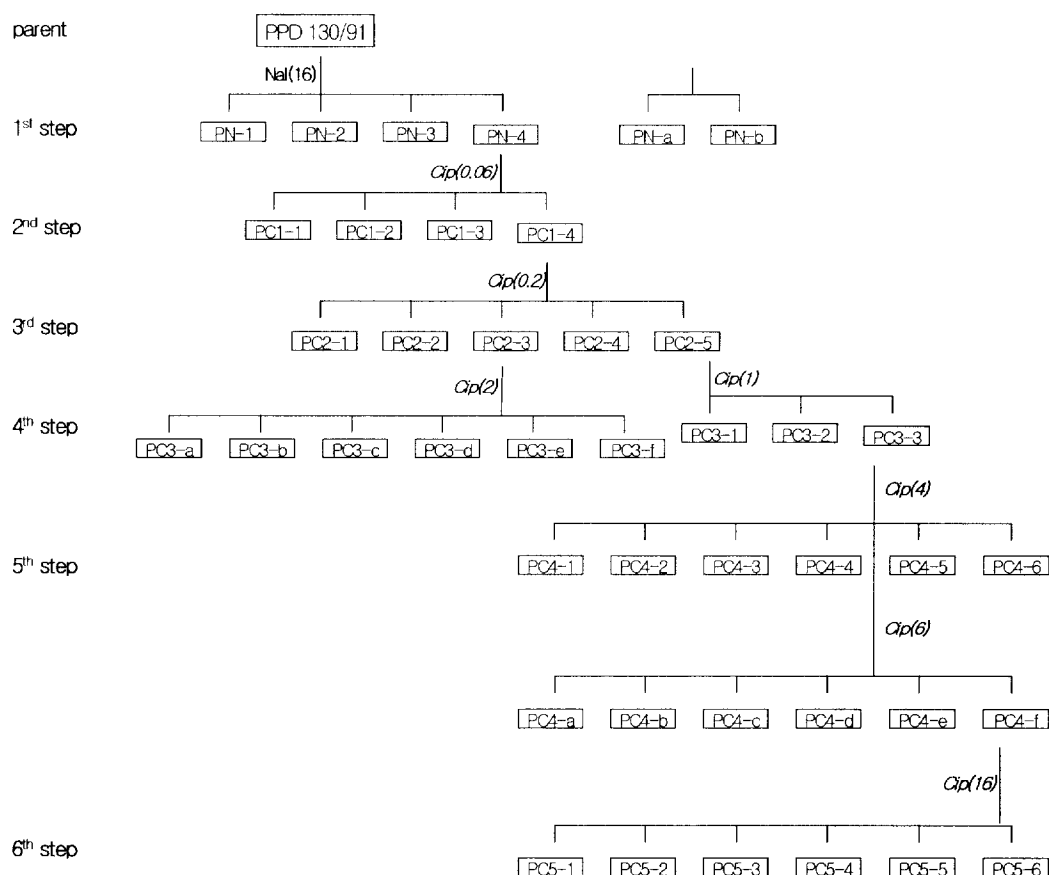


Fig. 9. Relationships between *E. tarda* PPD 130/91 and quinolone-resistant mutants PN1 to PC5-6 selected stepwise expose to nalidixic acid (NA) and ciprofloxacin (CIP). The number outside a parenthesis indicate the concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) used in the selection steps.

5. MAMA primer 제작 및 PCR

일부의 채집균과 *in vitro* 변이주의 *gyrA* gene의 염기 서열을 분석한 결과 일괄적인 변이를 관찰할 수 있었다. 83번이나 87번의 아미노산의 변이가 관찰된 반면 83, 87번 아미노산이 모두 변한 것은 관찰할 수 없었다. 이런 변이를 찾기 위해서는 각 균주 마다의 염기 서열 분석이 필요하고 채집균과 변이주 전부의 염기 서열을 분석하기에는 시간적으로나 비용적으로 부담이 따른다. 그래서 이 실험에서는 mismatch amplification mutation assay (MAMA) primer를 이용한 PCR법으로 간단하고 정확하게 GyrA의 아미노산 변이를 찾고자 하였다.

WGYRS, MAMAGYR83, GYRS1R primer을 이용한 PCR에서 감수성 균인 GE1은 776 bp의 product와 함께 484 bp의 product를 생성하였다. 이에 비해 83번째 아미노산 잔기에 변이가 있는 내성균인 KFE, RE1인 484 bp의 product를 생성하지 않아 83번 아미노산 잔기의 변이 유무를 관찰할 수 있었다.

WGYRS, MAMAGYR87, GYRS1R primer을 이용한 PCR에서도 감수성 균인 PPD 130/91은 776 bp의 product와 함께 497 bp의 product를 생성하였지만 87번째 아미노산 잔기의 변이가 있는 *E. tarda* 변이주는 497 bp의 product를 형성하지 않았다 (Fig. 10).

이 결과를 바탕으로 앞에서 분석하지 못한 채집균 및 *in vitro* 변이주를 test한 결과 90%이상의 정확성을 나타내었으며, test한 모든 채집균 중 내성균은 83번째 아미노산, *in vitro*상의 변이주들은 87번째 아미노산의 변이가 확인되었다 (Fig. 11). 하지만 83, 87번 아미노산이 같이 변한 균주는 발견할 수 없었으며 그 원인을 알아보기 위하여 채집 균주 중 하나인 KFE도 같은 방법으로

ciprofloxacin에 노출시켜 83번에 이은 87번 아미노산의 변이 유무를 알아보고자 하였다. 실험 결과 KFE는 2단계에 걸치서 변이가 유도 되었으며, MAMA PCR 결과 83번에 이어 87번의 아미노산 역시 변이가 관찰되었다 (Fig. 11).

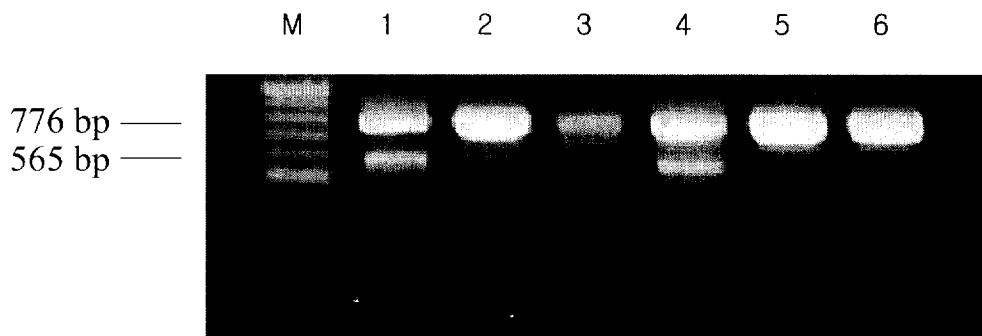
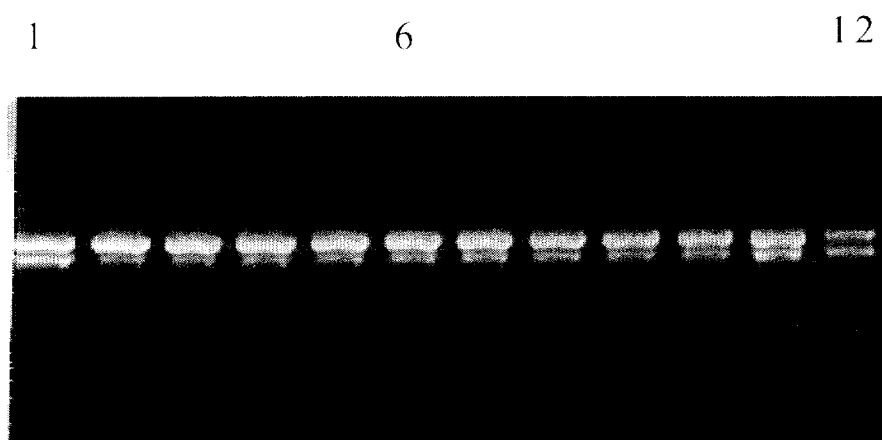
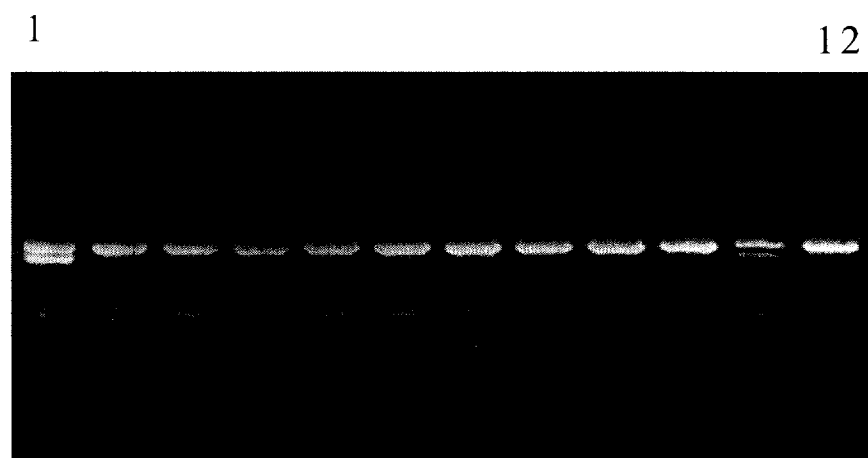


Fig. 10. Agarose gel of *E. tarda* MAMA PCR products. Lane 2, 3 ,5 ,6 indicate the 776 bp PCR products obtained from strains with mutation in *gyrA*, respectively (RE1, KFE, PN1-4, PC1-4 respectively). Lanes 1, 4 indicate that strains without corresponding mutations generate two fragments (GE1 776/484 bp, PPD 130/91 776/497 bp, respectively). Lane M, DNA marker (100 bp ladder).



(A)



(B)

Fig. 11. Agarose gel of *E. tarda* MAMA PCR products. (A), Products tested with MAMA primers from clinical isolates (quinolone resistance isolates) and *in vitro* mutants. Lane 1~6 indicate clinical isolates. Lane 7~12 indicate *in vitro* mutants. (B), Products tested with MAMAGYR87 primers from *in vitro* mutants (KFE Mutants). Lane 1 indicate KFE. Lane 2~12 indicate KFE mutant.

IV. 고찰

현재 어류의 양식 산업에 있어 *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus* sp. 등의 감염에 의한 세균성 질병으로 입는 경제적 손실은 심각하며, 그 중에 *Edwardsiella tarda*는 해수 및 담수에서 발병시켜 해마다 심각한 피해를 주고 있다. *Edwardsiella tarda*를 포함하는 세균성 질병의 대한 대처 방법으로 주로 항생제가 사용되어 왔는데 항생제의 부적절한 사용으로 말미암아 세균의 항생제 내성 증가, 내성의 전이 및 다제 내성의 획득 등으로 인하여 질병의 치료에 어려움을 겪고 있다.

1929년 플레밍에 의해 penicillin이 발견된 이후로 수많은 항생제가 개발되었다. 개발 초기에는 세균이나 곰팡이에서 분리 정제하여 사용하였으나, 최근에는 분자의 화학적 변형에 의한 항생제가 많이 개발되고 있다 (마, 1988). 이러한 항생제들 중 하나인 quinolones는 nalidixic acid의 개발을 시작으로 여러 세대의 항생제가 개발되었으며 일부는 개발 중이다. 현재 우리 나라 수산업에 사용되는 quinolones는 nalidixic acid, oxolinic acid, norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, pefloxacin등이 있으며, *E. tarda*를 포함하는 세균성 질병의 치료에 사용되고 있다. 하지만 우리 나라에서는 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 우리 나라 양어장의 병어로부터 분리한 *E. tarda*로부터 quinolones의 내성을 조사하고 내성 획득의 원인을 구명하고자 하였다.

1994~2003년까지 우리 나라 연안의 양어장의 병어로부터 136개의 *E. tarda* 균주를 얻을 수 있었다 (Table 1). 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 6). 또한 이러한 균들의 plasmid 분리에서 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 파악하고자 하였다. 9종의 그람 음성균에서 *gyrA* gene을 비교하여 제작된 degenerate primer로 623 bp의 염기 서열을 결정할 수 있었으며, cassette ligation-mediated PCR로 전체 염기 서열을 결정할 수 있었다. 여기서 결정된 *E. tarda*의 *gyrA* gene은 다른 내성 세균들의 *gyrA* gene 및 *parC* gene과 상동성을 보였으며 이 결과로 여기서 밝힌 gene이 *gyrA* gene임을 확인할 수 있었다 (Table 7).

그리고 대표적인 그람 음성균인 *E. coli*와 *gyrA*를 비교한 결과 3개의 아미노산을 더 가지고 있었으나 *C. jejuni*, *A. salmonicida*, *P. aeruginosa*의 35, 48, 43번째 아미노산에 상응하는 intragenic stretches를 포함하고 있지 않았다 (Wang et al., 1993; Oppegaard et al., 1996; Kureishi et al., 1994). 염기 서열을 분석한 결과 supercoiling-dependent transcription에 관여하는 putative promoter, ribosome binding site, inverted repeating sequences를 발견할 수 있었으며, catalytic Tyr-122도 발견할 수 있었다 (Horowitz and Wang, 1987).

그러나 *gyrA* gene의 upstream 과 downstream의 염기 서열을 분석한 결과 어떤 다른 균의 *gyrB* gene과도 상동성을 보이지 않았다. 이러한 분석으로 *gyrA* gene과 *gyrB* gene은 근접하지 않음을 알 수 있었고 이와 같은 Noncontiguous gyrase genes는 많은 수의 그람 음성균에서 발견된다 (Dimri and Das, 1990; Kureishi et al., 1994; Wang et al., 1993). 반면 *gyrB-gyrA*로 근접한 gyrase genes는 *Mycoplasma pneumoniae* 등과 같은 일부의 그람 양성 세균에서 보고되었다 (Colman et al., 1990; Moriya et al., 1985).

GyrA gene의 complementation 실험을 위하여, promoter 부위를 포함하는 *E. tarda gyrA* gene의 전체를 plasmid에 cloning하여 temperature-sensitive *gyrA* mutant인 *E. coli* KNK453에 transformation시켰다. Transformation된 plasmid는 *E. coli* KNK453이 43℃에서 자랄 수 있게 하였으며 이 결과는 1) 완전한 *gyrA* gene이 성공적으로 복제되었다는 것 2) *E. tarda gyrA* gene의 promoter 부위가 *E. coli* system에서도 작용을 한다는 것 3) *E. tarda GyrA-E. coli GyrB* holoenzyme 복합체가 기능적으로 작용한다는 것을 나타내는 결과라 할 수 있다.

ParC gene은 전체의 염기 서열을 확인하지는 못하였지만, 이미 알려져 있는 여러 다른 균들과 상동성을 비교함으로써 부분적인 염기 서열을 확인할 수 있었다.

다음으로 Quinolone 내성에 따른 *gyrA* gene의 변이 특성 및 정도를 알아보기 위하여 각 gene들의 QRDR의 염기 서열을 분석하였다.

*E. coli*의 경우 GyrA의 Ser-83과 Glu-87의 아미노산의 변이가 quinolone 내성의 가장 주요한 변이로 알려져 있으며 (Vila et al., 1994; Yolanda et al.,

2003), 이러한 보고를 바탕으로 우선적으로 GyrA의 QRDR을 분석한 결과 모든 내성균에서 83번 아미노산 Ser의 Arg로의 변화가 관찰되었다 (Table 8). 이처럼 아미노산 잔기의 Ser-83의 Arg으로의 단일 변이는 *Enterococcus faecalis*와 *A. salmonicida*의 quinolone 내성균에서 보고된 바 있었다 (Korten et al., 1994; Tankovic et al., 1996). 이외의 GyrA에서의 다른 변이가 관찰되지 않았지만, 이들 내성균은 여러 quinolone 항생제에 다양한 MIC값을 보였다. 이는 GyrA의 변이에 의한 내성 획득이 아닌 다른 원인으로 생각할 수 있으며, ParC, GyrB, ParE의 아미노산 변이가 그 원인 중 하나로 추정할 수 있다. 그리고 이러한 83번의 변이만으로는 내성 획득을 설명하기 다소 부족한 점이 있어, wild type의 *E. tarda* 균을 *in vitro* 상에서 quinolone에 대해 내성을 유도하는 실험을 실시하였다. 이 실험은 항생제가 첨가된 MH agar에 균을 노출시킴으로써 실험적으로 gene의 변이를 유도하는 실험으로 총 6단계로 실행하였다. 각 단계의 균들을 임의적으로 선택하여 GyrA 아미노산 변이를 분석하였다 (Fig. 7, Table 9). 결과 GyrA에서는 모든 단계에서 87-Asp 가 Gly로 변이를 보였다. 이는 앞에서 분석한 내성균과는 다른 변이로 *E. coli*에서와 같이 아미노산 83번과 함께 87번 또한 내성의 획득에 관여됨을 알 수 있었다. 하지만 83, 87번의 아미노산이 같이 변이를 보이는 균주는 관찰할 수 없었는데, 이는 그 내성치가 다른 균처럼 급격하게 높지 않기 때문일 것이라 추정되며, 추가적인 실험으로 83번 아미노산의 변이를 보이는 채집균을 다시 *in vitro*상에서 변이를 유도한 결과 83번과 87번의 아미노산이 같이 변하는 것을 확인하였으며 *in vitro* 변이주를 계속적으로 높은 항생제에 노출시키면 같은 결과를 보일 것이라고 추측된다.

또한 본 연구에서는 GyrA의 83, 87번의 아미노산의 염기 서열을 바탕으로

MAMA primer를 제작하였다. 이는 앞에서의 실험 결과 그 부분의 염기가 특이적으로 변한 것을 바탕으로 제작되었으며, 변이를 보이는 균의 염기 서열과는 2개의 염기를 바꾸어 줌으로 변이가 있는 균에서는 특이적인 product를 형성하지 못하게 한다. 이 primer는 test한 거의 모든 균에서 정확한 결과를 보여주었다 (Fig. 9, 10). 많은 수의 sample을 cloning하여 QRDR의 염기 서열을 분석하기에는 무리가 따르며, 이러한 PCR법은 이러한 과정 없이 PCR 결과만으로 GyrA의 변이 정도를 파악할 수 있으므로 간단하고 편리한 방법이라 할 수 있다.

본 연구에서는 처음으로 *E. tarda*의 quinolone 내성 획득에 관여하는 *gyrA* gene의 염기 서열을 결정하였으며 quinolone의 내성 획득과 *gyrA* gene의 변이와의 관계를 설명하였다.

앞으로 이러한 gene의 변이 이외에도 quinolone 내성 획득의 원인이 되는 *parC*, *parE*, *gyrB* gene 및, efflux system에 관여하는 gene에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다. 또한 *in vitro* 실험 외에도 *E. tarda* 균을 어류에 감염시키고 항생제를 투여하여 실험 시 분리되는 *E. tarda*의 내성 획득의 정도와, 내성 획득에 관여하는 gene의 변이를 분석하는 *in vivo* 실험 또한 추가되어야 하겠다.

V. 요약

Quinolone 계열 항생제는 최근 수산업에서 많이 이용되는 항생제 중 하나이며, *E. tarda*를 포함하는 여러 세균성 질병의 치료에 이용되어 왔다. 하지만 quinolone 항생제에 대한 내성균의 출현이 보고되기 시작했고, *E. coli*를 포함하는 여러 균들에 대해서 이런 내성균들이 연구되기 시작했다. Quinolone 내성 획득은 DNA gyrase 나 Topoisomerase IV를 암호화하는 gene의 변이에 의한 것이 주를 이루며 이중 DNA gyrase subunit A (*gyrA*) gene의 변이가 주요한 내성 기작이며 이러한 변이는 quinolone resistance-determining region (QRDR)이라 불리는 N-terminus의 특이적인 부위에서 대부분 발생한다.

본 연구에서는 *E. tarda*의 quinolone 내성 획득의 원인을 분석하기 위하여 이미 밝혀져 있는 여러 균들의 *gyrA* gene을 비교하여 degenerated primer를 제작하였고 이 primer를 이용한 PCR로 QRDR의 염기 서열을 결정하였으며, cassette ligation-mediated PCR법으로 *gyrA*의 전체 염기 서열을 결정할 수 있었다.

GyrA gene은 878개의 아미노산을 암호화하는 ORF (open reading frame)을 가지고 있었으며 ribosome binding site 및 putative promoter, inverted repeating sequence도 확인할 수 있었다. 또한 *E. coli* KNK453으로의 transformation 실험 및 다른 균들과의 염기 서열 비교로 *E. tarda*의 *gyrA* gene을 확인할 수 있었다. 이렇게 결정된 *gyrA* gene을 바탕으로 1994년부터 2003년까지 우리 나라 양어장의 감염어로부터 분리된 *E. tarda*의 QRDR을 분석한 결과 83번 아미노산의 변이를 확인할 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.

그리고 추가적인 실험으로 효과적으로 내성균에서의 GyrA의 변이를 확인하기 위하여 mismatch amplification mutation assay PCR (MAMA PCR)를 실시하였으며, 실험 결과 GyrA의 83, 87번의 아미노산 변이를 간편하고 정확하게 판단 할 수 있었다.

본 연구는 *E. tarda gyrA* gene에 대한 최초의 보고이며, 앞으로는 *gyrA* gene과 더불어 내성 획득의 원인이 되는 *gyrB*, *parC*, *parE* gene 및, efflux system에 관여하는 gene에 대한 연구도 필요할 것으로 여겨진다.

VI. 감사의 글

너무나 길게 보였던 대학원 2년의 생활이 이제 다 끝나가고 있습니다. 대학원 진학을 어렵게 결정한 만큼 후회 없이 졸업하고 싶었지만 돌아보면 나태했던 시간들에 대한 약간의 아쉬움이 남습니다. 이제는 부족하지만 이렇게 학위논문을 낼 수 있게 도와주신 분들에게 감사함을 전하고자 합니다.

어려움이 있을 때면 항상 방향을 제시해주고 바른길로 이끌어 주신 정현도 지도교수님께 먼저 무한한 감사의 마음을 전합니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문에 관심을 가져주시고 충고를 아끼지 않으셨던 김기홍 교수님과 박수일 교수님께 진심으로 감사드리며 언제나 관심을 가지고 지켜봐주신 정준기 교수님, 허민도 교수님, 강주찬 교수님께도 감사함을 전합니다.

제가 이렇게 무사히 실험을 마칠 수 있도록 도와주신 실험실 선·후배님들에게도 감사함을 전하고 싶습니다. 실험실 선배이면서 언제나 친근했던 준범형, 려진 커플, 서로가 힘이 되었던 나의 동기들 재훈이, 호열이, 신후에게 감사드립니다. 그리고 지금은 사회에서 열심히 일하고 있을 대심이, 영화에게도 감사드리며, 뒤에서 늘 힘이 되어 주었던 현정, 지효, 영수, 상훈, 민수, 혜진, 소혜 그리고 저와 함께 했던 모든 진단 생화학 실험실 선·후배님들에게도 감사함을 전합니다.

마지막으로 멀리서 저를 지켜봐주시고 언제나 저를 믿어주신 저의 부모님, 누나, 매형, 호범, 그리고 올해 세상에 태어난 저의 사랑스런 조카, 혜민이에게 이 논문을 바칩니다.

논문을 마무리함과 동시에 어디서든 열심히 할 것을 다짐하며 이 논문을 마칩니다.

VII. 참고문헌

- Adams, D.E., Shekhtman, E.M., Zechiedrich, E.L., Schmid, N.B. and Cozzarelli, N.R., 1992. The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*. 71, 277-288.
- Aoki, T., 1988. Drug-resistant plasmids from fish pathogens. *Microbiol. Sci. Rev.* 5, 219-223.
- Baxa D.V., Kawai, K., Ando, H. and Kusuda, R., 1985. *Edwardsiella tarda* and *Staphylococcus aureus* isolated from cultured red sea bream. *Rep. Biol. Inst.* 7, 1-8.
- Bébéar, C.M., Grau, O., Charron, A., Renaudin, H., Gruson, D. and Bébéar, C., 2000. Cloning and Nucleotide Sequence of the DNA Gyrase (*gyrA*) Gene from *Mycoplasma hominis* and Characterization of Quinolone-Resistant Mutants Selected *In Vitro* with Trovafloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2719-2727.
- Capilla, S., Ruiz, J., Goni, P., Castillo, J., Rubio, M.C., Jimenez de Anta, M.T., Gomez-Lus, R. and Vila, J., 2004. Characterization of the molecular mechanisms of quinolone resistant in *Yersinia enterocolitica* O:3 clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1068-1071.

- Chen, J.D. and Huang, S.L., 1996. Hemolysin from *Edwardsiella tarda* strain ET-16 isolated from eel *Anguilla japonica* identified as an hole-forming toxin. Fisheries Science. 62, 538-542.
- Colman, S.D., Hu, P.C. and Bott, K.F., 1990. *Mycoplasma pneumoniae* DNA gyrase genes. Mol. Microbiol. 4, 1129-1134.
- Dimri, G.P. and Das, H.K., 1990. Cloning and sequence analysis of *gyrA* gene of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 18, 151-156.
- Drlica, K. and Zhao, X.L., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61, 377-392.
- Goni-Urriza, M., Arpin, C., Capdepuy, M., Dubois, V., Caumette, P. and Quentin, C., 2002. Type II topoisomerase quinolone resistance-determining regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* complexes and mutations associated with quinolone resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 350-359.
- Herman, R.L. and Bullock, G.L., 1986. Pathology caused by the bacterium *Edwardsiella tarda* in striped bass. Trans. Amer. Fish. Soc. 115, 232-235.
- Hooper, D.C., 1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin. Infect. Dis. 27, S54-S63.

- Horii, T., Suzuki, Y., Monji, A., Morita, M., Muramatsu, H., Kondo, Y., Doi, M., Takeshita, A., Kanno, T. and Maekawa, M., 2003. Detection of mutations in quinolone resistance-determining regions in levofloxacin and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: effects of the mutations on fluoroquinolone MICs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 46, 139-145.
- Horowitz, D.S. and Wang, J.C., 1987. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 262, 5339-5344.
- Horowitz, M.S. and Loeb, L.A., 1988. An *E. coli* promoter that regulates transcription by DNA superhelix-induced cruciform extrusion. *Science*. 241, 703-705.
- Janda, J.M., Abott, S.L., 1993. Expression of an iron-regulated hemolysin in *Edwardsiella tarda*. *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 275-280.
- Kim, J.H., Cho, E.H., Kim, K.S., Kim, H.Y. and Kim, Y.M., 1998. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from *Serratia marcescens* and characterization of mutations in *gyrA* of quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 190-193.
- Korten, V., Huang, W.M. and Murray, B.E., 1994. Analysis by PCR and direct DNA sequencing of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 2091-2094.

- Kreuzer, K.N. and Cozzarelli, N.R., 1979. *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J. Bacteriol.* 140, 424-435.
- Kubota, S.S., Kaige, N., Miyazaki, T. and Miyashita, T., 1981. Histopathological studies on edwardsiellosis of tilapia. *Bull. Fac. Fish. Mie. Univ.* 9, 155-165.
- Kureishi, A., Diver, J.M., Beckthold, B., Schollaardt, T. and Bryan, L.E., 1994. Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase *gyrA* gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38, 1944-1952.
- Ling, S.H.M., Wang, X.H., Xie, L., Lim T.M. and Leung, K.Y., 2000. Use of green Fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiol.* 146, 7-19.
- Moore, R.A., Beckthold, B., Wkureishiong, S.A. and Bryan, L.E., 1995. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 107-111.
- Moriya, S., Ogasawara, N. and Yoshikawa, H., 1985. Structure and function of the region of the replication origin of the *Bacillus subtilis* chromosome. III. Nucleotide sequence of some 10,000 base pairs in the origin region. *Nucleic Acids Res.* 13, 2251-2265.

- Musso, D., Drancourt, M., Ossicini, S. and Raoult, D., 1996. Sequence of quinolone resistance-determining region of *gyrA* gene for clinical isolates and for an In vitro-selected quinolone-resistant strain of *Coxiella burnetii*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 870-873.
- Nakamura, S., 1997. Mechanisms of quinolone resistance. J. Infect. Chemother. 3, 128-138.
- Nakatsugawa, T., 1983. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. Fish Pathol. 18, 99-101.
- Okuda, J., Hayakawa, E., Nishibuchi, M. and Nishino, T., 1999. Sequence analysis of the *gyrA* and *parC* homologues of a wild-type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its fluoroquinolone-resistant mutants. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1156-1162.
- Oppegard, H. and Sorum, H., 1996. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 1126-1133.
- Peng, H. and Mariani, K.V., 1993. *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. J. Biol. Chem. 268, 24481-24490.

- Qiang, Y.Z., Qin, T., Fu, W., Cheng, W.P., Li, Y.S. and Yi, G., 2002. Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 49, 549-552.
- Rosanas, A., Barbe, J. and Gibert, I., 1995. Cloning and sequencing of the *gyrA* gene from the plant pathogen *Erwinia carotovora*. Gene. 161, 11-14.
- Stock, I. and Wiedemann, B., 2001. Natural antibiotic susceptibilities of *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, and *E. hoshinae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2245-2255.
- Swanberg, S.L. and Wang, J.C., 1987. Cloning and sequencing of the *Escherichia coli gyrA* gene coding for the A subunit of DNA gyrase. J. Mol. Biol. 197, 729-736.
- Tankovic, J., Mahjoubi, F., Courvalin, P., Duval, J. and Leclercq, R., 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. Antimicrob. Agents Chemother. 40, 2558-2561.
- Vila, J., Ruiz, J., Marco, F., Barcelo, A., Goni, P., Giralt, E. and Jimenez de Anta, T., 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. Antimicrob. Agents Chemother. 38, 2477-2479.

Wang, Y., Huang, W.M. and Taylor, D.E., 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni* *gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 457-463.

Yolanda, Sáenz., Myriam, Zarazara., Laura, Briñas., Fernanda, Ruiz-Larrea. and Carmen, Torres., 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1001-1005.

김명석. 1997. 환경적 변화에 따른 나일 틸라피아의 oxolinic acid 흡수와 배설. 부경대학교 어병학과 석사논문.

김종명. 1993. 테트라사이클린 내성 황색포도상구균으로부터 테트라사이클린 내성 유전자의 클로닝. 경성대학교 약학과 박사논문.

마집술. 1988. 항생제 및 약품에 대한 내성세균의 문제. 한국영양사료학회지, 제 12권, 58-68.

최민순, 김영길. 1994. 양만장 사육조에서 분리한 *Edwardsiella tarda* 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.