

사람대장추출물에서 몇가지 항생제들에 대한 저항성유전자의 발견에 대한 연구

문학민, 김인철, 한경애

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《우리는 가까운 앞날에 전반적인 과학기술분야에서 세계를 디디고 올라설수 있다는 배심을 가지고 첨단돌파의 기적들을 련이어 창조하여야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 40페이지)

초계놈학적연구는 현재 세계적으로 새로운 미생물종의 발견과 생물의 다양성을 밝히기 위한 첨단연구방법의 하나로 되고있으며 그 응용의 한 고리로 항생제저항성유전자를 발견하기 위한 분야에까지 확대되고있다.[1, 2]

우리는 초계놈학적수법을 리용한 새로운 저항성유전자의 서고구축과 생명정보학적연구, 유전자발현 및 선발을 통하여 새로운 항생제저항성유전자를 발견한 연구결과에 대하여 논의하였다.

재료와 방법

사람대장세포에 있는 항생제저항성유전자를 발견하기 위하여 1명의 건강한 사람과 3명의 여러가지 항생제를 장복하여온 환자의 대장추출물로부터 게놈DNA를 추출하였다. 항생제저항성게놈토막들에 대한 서고구축과 운반체제조합, 유전자의 항생제저항성을 검증하기 위하여 QIAprep Spin Miniprep Kit, Phusion DNA polymerase, 5×HF buffer, 10mmol/L dNTPs, QIAquick PCR Purification Kit, T4 DNA Ligase, 10×T4 DNA Ligase Buffer, CompactPrep Plasmid Midi Kit, FastAP Thermosensitive Alkaline phosphatase, T4 Polynucleotide Kinase 등 각종 DNA증폭, 재조합, 추출시약들을 리용하였다. 또한 항생제저항성을 검증하기 위하여 단백질발현운반체들인 pUC19와 pSK011을 리용하였다.

사람대장추출물로부터 해당한 DNA추출시약을 리용하여 게놈DNA를 추출하고 초음파로 1.5~3kb정도크기의 토막으로 절단하였으며 리가제를 리용하여 게놈토막을 단백질발현운반체인 pUC19에 클론화하였다. 재조합발현운반체를 대장균세포에 형질감염시켜 7가지 항생제(클로람페니콜, 테트라찌클린, 옥시테트라찌클린, 토브라마이신, 아미카신, 겐타미친, 아지스로미친)배지에서 선발하였다. 선발한 균무지로부터 항생제저항성을 일으키는 플라스미드를 추출하였으며 PCR결과 DNA삽입물만이 증폭되였다. 증폭된 게놈토막DNA들에 대한 배렬분석을 진행하여 항생제저항성게놈토막서고를 구축하였다. 다음 자료기지 프로그램들을 리용하여 저항성게놈토막들에서 열린읽기들들을 찾고 또한 개별적인 열린읽기들들에 대한 상동성검색을 진행하였다.

상동검색한 열린읽기틀들을 증폭하고 유전자발현운반체에 클론화하여 대장균세포에 형질전환시킨 다음 항생제배지에서 그 저항성을 검증하였다. 저항성세포균무지를 얻고 플라즈미드추출과 균무지유전자증폭을 리용하여 해당한 저항성유전자의 존재를 확인하였다.

연구 결과

1) 조계농학적방법을 통한 항생제저항성게놈토막서고의 구축

4가지 서로 다른 대장추출물로부터 추출한 항생제저항성을 가지는 게놈토막들의 형질전환률은 표 1과 같다.

표 1에서 보는바와 같이 건강한 사람의 대장에는 항생제를 써오던 환자들에 비하여 많은 수의 저항성게놈토막이 들어있었다. 형질전환된 세포들을 각종 항생제배지에서 선발하여 균무지를 얻고 그로부터 플라즈미드를 얻은 다음 해당한 삽입물만 증폭하고 배렬분석하여 항생제저항성게놈토막서고를 구축하였다. 구축된 서고에서 시료와 항생제저항성에 의하여 구분되는 게놈토막들의 수는 표 2와 같다.

표 1. 항생제저항성게놈토막서고를 이루는 토막DNA들의 형질전환률

시료	형질전환률/(CFU·μg ⁻¹)
대장게놈시료 1(건강한 사람)	5.8·10 ⁷
대장게놈시료 2(환자 1)	5.2·10 ⁷
대장게놈시료 3(환자 2)	1.6·10 ⁷
대장게놈시료 4(환자 3)	8.2·10 ⁶

표 2. 시료와 항생제에 따르는 저항성게놈토막들의 수

항생제종류	저항성게놈토막수/개			
	대장게놈시료 1	대장게놈시료 2	대장게놈시료 3	대장게놈시료 4
클로람페니콜	35	78	39	33
테트라찌클린	23	10	10	11
옥시테트라찌클린	23	19	17	12
토브라미친	31	48	34	29
아미카신	17	40	24	30
겐타미친	35	72	18	34
아지스로미친	7	49	15	—

표 2에서 보는바와 같이 항생제저항성게놈토막들의 수를 분석한 결과 클로람페니콜저항성게놈토막들의 수가 다른 종류의 저항성게놈토막들의 수보다 많다는것을 알수 있다.

2) 항생제저항성유전자의 발견 및 검증

생명정보학적분석을 통하여 리보솜단백질, 전사인자, 트랜스포사제, 인테그라제, 재조합효소, tRNA합성효소, 메틸라제와 막단백질과 관련된 50개의 항생제저항성DNA토막들을 구별하고 선발된 토막들에 들어있는 81개의 열린읽기틀들을 증폭하였다. 증폭된 81개의 열린읽기틀들을 재조합운반체에 태우고 저항성실험을 진행한 결과 클로람페니콜저항성유전자 3개, 테트라찌클린저항성유전자 1개, 옥시테트라찌클린저항성유전자 3개, 토브라미친저항성유전자 2개, 아미카신저항성유전자 1개, 겐타미친저항성유전자 5개, 아지스로미친저

항성 유전자 2개를 발견검증하였다.(표 3)

표 3. 발견검증된 새로운 항생제저항성유전자들의 상동관계

항생제저항성	상동유전자	상동률/%	개체명
클로람페니콜	다제약물수송인자	100	Enterobacteriaceae
	시토신메틸트랜스페라제	51	<i>Prevotella</i> sp. P4-65
	MBL포갠메탈로히드롤라제	100	<i>Enterobacter cloacae</i> complex
테트라찌클린	전사조절인자	100	<i>Enterobacter</i> sp. EGD-HP1
옥시테트라찌클린	클로람페니콜O-아세틸트랜스페라제	97	<i>Bacteroides coprocola</i>
	다제약물수송인자	100	<i>Enterobacter</i>
	다제약물수송인자	100	<i>Enterobacter</i> sp. EGD-HP1
토브라마이쥬	DNA의존RNA폴리메라제 α 아단위	100	<i>Bacteroides uniformis</i>
	다제약물수송인자	100	<i>Enterobacter</i> sp. SST3
아미카신	GTP아제 RsgA	100	<i>Bacteroides</i>
겐타미쥬	tRNA-2-메틸티오-N(6)-디메틸알릴아데노신합성효소	100	<i>Bacteroides</i>
	막단백질	100	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	SusC/RagA족 TonB-관련외막단백질	100	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
	리보플라빈생합성단백질 RibBA	100	<i>Bacterioides</i>
	세포벽물작용분해효소 SleB	99	<i>Ruminococcus</i> sp. CAG:57
아지스로미쥬	데메틸메나키논메틸트랜스페라제	99	<i>Bacteroides</i>
	재조합효소 XerD	96	<i>Alistipes onderdonkii</i>

맺는 말

1) 초계놈학적연구방법을 도입하여 4가지 대장추출물로부터 얻은 게놈토막DNA들로 7가지 항생제에 대한 항생제저항성게놈토막서고를 구축하였다. 구축된 게놈토막서고에서 클로람페니콜저항성토막들은 다른 종류의 저항성토막들에 비해 그 수가 많았다.

2) 50개의 항생제저항성DNA토막들에 있는 81개의 열린읽기틀들을 발현운반체에 태우고 항생제저항성실험을 한 결과 18개의 새로운 항생제저항성유전자들을 발견검증하였다.

참고 문헌

- [1] M. O. A. Sommer et al.; Science, 325, 1128, 2009.
- [2] A. M. Moore et al.; Front. Microbiol., 2, 188, 2011.

On Discovery of Resistance Genes in Human Intestine Extracts to Some Antibiotics

Mun Hak Min, Kim In Chol and Han Kyong Ae

The library of the antibiotic resistance(AR) DNA fragments was constructed from 4 different human intestines extracts using the metagenomics for 7 different antibiotics. The chloramphenicol resistance DNA fragments were most abundant among 7 different AR fragments.

81 ORFs within 50 AR DNA fragments were cloned on the expression vector and selected for AR genes. As the result, 18 noble AR genes to 7 antibiotics were discovered and verified.

Key words: antibiotic resistance gene, human intestine extract