

А.Н.Мокриевич, Н.А.Шишкова, И.А.Дятлов, В.М.Павлов

**ОСОБЕННОСТИ КОНЪЮГАТИВНОГО ПЕРЕНОСА ПЛАЗМИДЫ pSa  
МЕЖДУ ESCHERICHIA COLI И FRANCISELLA TULARENSIS**ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk,  
Российская Федерация

В процессе конъюгативного переноса плазмиды pSa из штамма *E. coli* C600(pSa) в штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 происходит ее модификация. Модифицированная форма плазмиды pSa (pSa') обладает повышенной способностью к прямому и обратному переносу между бактериями *E. coli* и *F. tularensis* (частота  $5 \cdot 10^{-4}$  и  $1 \cdot 10^{-4}$  на реципиентную клетку, соответственно) и реплицируется в туляремином микробе. Внутривидовой перенос плазмиды pSa' между штаммами *F. tularensis* происходит с крайне низкой частотой ( $2 \cdot 10^{-10}$  на реципиентную клетку). Плазида pSa' в бактерии *E. coli* C600 образует несколько топологических форм с разной электрофоретической подвижностью, а в туляремином микробе эта плазида, по данным электрофореза, имеет только одну форму. При переносе плазмиды из клеток *E. coli* в клетки *F. tularensis* каждый индивидуальный клон туляреминого микроба содержит плазмиду, отличающуюся по электрофоретической подвижности от подвижности плазмид из других клонов.

*Ключевые слова:* *Francisella tularensis*, конъюгация, модификация плазмиды pSa, *Escherichia coli*.

A.N.Mokrievich, N.A.Shishkova, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

**Peculiarities of the Conjugative pSa Plasmid Transfer from *Escherichia Coli*  
Into *Francisella Tularensis***

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The conditions of conjugative transfer of pSa plasmid from *E. coli* to *F. tularensis* have been investigated. It has been shown that pSa plasmid is modified under the process of its transfer from *E. coli* C600(pSa) strain into *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain 15. Modified variant of pSa plasmid (pSa') has an enhanced capacity to direct and inverted transfer between *E. coli* and *F. tularensis* (the frequency is  $5 \cdot 10^{-4}$  and  $1 \cdot 10^{-4}$  per a recipient cell, respectively) and replicates in tularemia microbe. Intraspecific transfer of the pSa' plasmid between *F. tularensis* strains occurs at an extremely slow rate ( $2 \cdot 10^{-10}$  per a recipient cell). pSa' plasmid molds several topological shapes with variable electrophoretic mobility in *E. coli* C600, while in tularemia microbe, this plasmid has only one shape. After the transfer of the plasmid from *E. coli* cells into *F. tularensis* cells each individual clone of tularemia microbe possesses a plasmid which differs in its electrophoretic mobility from plasmids of other clones.

*Key words:* *Francisella tularensis*, conjugation, pSa plasmid modification, *Escherichia coli*.

Конъюгативная плазида pSa, относящаяся к группе несовместимости IncW, впервые была выделена в Японии из клинических изолятов шигелл [8]. Размер плазмиды, в зависимости от источника выделения, варьирует от 35 до 37 т.п.о. [5]. Плазида pSa может поддерживаться в широком круге бактерий (*Agrobacterium tumerfaciens* [4], *Pseudomonas mallei* и *Pseudomonas pseudomallei* [1], *Brucella abortus* [7]), куда она передавалась в результате межродового скрещивания. Впервые возможность переноса плазмиды pSa из клеток *E. coli* в клетки *F. tularensis* была показана А.П. Померанцевым и соавт. в 1991 г. [3], и этими авторами было сделано предположение о необходимости дополнительных генетических элементов (плунжерной плазмиды) для осуществления такого переноса.

В настоящей работе продолжено изучение условий конъюгативного переноса плазмиды pSa из *E. coli* в *F. tularensis* и свойств плазмид, выделенных из трансконъюгантов *F. tularensis*. Показано, что в процессе конъюгации плазида pSa' претерпевает изменения, приводящие к появлению способности автономно реплицироваться в клетках туляреминого микроба. Эффективность переноса плазмиды pSa' в клетки *F. tularensis* различных форм (SR и R) практически одинакова.

В работе были использованы штаммы *E. coli*:

C600, C600(pSa) и штаммы *F. tularensis*: 15, 15R, 15Sm(pK194), полученные из «ГКПМ-Оболensk».

*Конъюгативный перенос плазмид из клеток E. coli в штаммы F. tularensis.* Культуры штаммов *E. coli* C600(pSa) и *E. coli* C600(pSa') выращивались на среде LA с хлорамфениколом (10 мкг/мл) при температуре 37 °С в течение 18 ч. Культуры штаммов *F. tularensis* выращивались на среде ТА (3,8 % эритроцит-агара, 1 % высушенной крови крупного рогатого скота, 1 % глюкозы, 0,05 % цистеина, 0,0025 % тиамина хлорида, рН 7,2) с полимиксином Б (100 мкг/мл) при температуре 37 °С в течение 18 ч. Клетки донора и реципиента суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР), рН 7,4, смешивали по 50 мкл каждой суспензии (с концентрацией  $2 \cdot 10^9$  КОЕ мл<sup>-1</sup> для *E. coli* и  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ мл<sup>-1</sup> для *F. tularensis*) и наносили пятном на подсушенную поверхность среды LA. Скрещивание проводили при температуре 25 °С в течение 18 ч. После инкубации агаровую культуру суспендировали в ЗФР и высевали на селективный агар.

*Конъюгативный перенос плазмиды pSa' из клеток F. tularensis в клетки E. coli.* Культура *F. tularensis* 15(pSa') выращивалась на среде ТА с полимиксином Б и хлорамфениколом при температуре 37 °С в течение 18 ч. Культура *E. coli* C600 выращивалась на среде LA при температуре 37 °С в течение 18 ч.

Клетки донора и реципиента суспендировали в ЗФР (с концентрацией для *F. tularensis*  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ мл<sup>-1</sup> и для *E. coli*  $2 \cdot 10^9$  КОЕ мл<sup>-1</sup>). Для скрещивания смешивали по 50 мкл суспензий донора и реципиента и наносили пятном на подсушенную поверхность среды LA. Скрещивание проводили при температуре 37 °С в течение 6 ч. После инкубации агаровую культуру суспендировали в ЗФР и высевали на селективный агар.

*Конъюгативный перенос плазмиды pSa' между клетками F. tularensis.* Культура *F. tularensis* 15(pSa') выращивалась на среде ТА с полимиксином Б и хлорамфениколом при температуре 37 °С в течение 18 ч. Культура *F. tularensis* 15Sm(pK194) выращивалась на среде ТА с добавлением канамицина (40 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) при температуре 37 °С в течение 18 ч. Суспензии клеток донора и реципиента в ЗФР с концентрацией  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ мл<sup>-1</sup> и  $1 \cdot 10^{11}$  КОЕ мл<sup>-1</sup>, соответственно, смешивали по 50 мкл и наносили пятном на поверхность среды LA. Скрещивание проводили при температуре 37 °С в течение 18 ч. После инкубации агаровую культуру суспендировали в ЗФР и высевали на селективный агар.

Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*, гидролиз ДНК рестриктазами, электрофорез в агарозном геле и трансформацию плазмид в *E. coli* проводили по руководству [2]. Выделение плазмидной ДНК из *F. tularensis* и электропорацию плазмидных ДНК в *F. tularensis* выполняли по [6].

*Эксперименты на лабораторных животных.* В работе использовали беспородных белых мышей. Мышам (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 недель, массой 18–20 г) вводили подкожно бактериальную суспензию в дозе  $1 \cdot 10^2$  КОЕ на животное. На 6-й день проводили эвтаназию, забирали селезенки, суспендировали в 5 мл ЗФР и полученную суспензию, а также ее 10-кратные разведения высевали на среду ТА.

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал устанавливали при вероятности 95 %.

В результате скрещивания клеток *E. coli* C600(pSa) и *F. tularensis* 15 на селективной среде через 72 ч появились единичные хлорамфениколустойчивые колонии *F. tularensis*. Их количество возрастало до восьмого дня наблюдения и достигло порядка 1000. При пересеве 100 произвольно выбранных колоний все они росли на среде с хлорамфениколом. Скрининг плазмидной ДНК из 14 трансконъюгативных клонов, отобранных в разные сроки появления, показал наличие плазмидных полос выше области хромосомной ДНК во всех образцах. Частота межродового переноса плазмиды pSa в клетки *F. tularensis* составляла порядка  $1 \cdot 10^{-7}$  на одну клетку реципиента. Каждый проанализированный клон содержал по одной плазмиде. Электрофоретическая подвижность в агарозном геле этих плазмид была различной.

Рестрикционный анализ ДНК плазмид с помощью рестриктаз (BamHI, BglII, EcoRI, KpnI, PstI,

SspII) не выявил отличий в количестве и размере получаемых фрагментов. В частности, один из BglII-фрагментов этих плазмид совпадал по размерам с BglII-фрагментом плазмиды pSa, содержащим область репликации.

Плазмидная ДНК из одного произвольно выбранного клона *F. tularensis* была названа pSa', и клон, содержащий плазмиду pSa', маркированный как *F. tularensis* 15(pSa'), использовался в дальнейших экспериментах.

При скрещивании клеток *F. tularensis* 15(pSa') и *E. coli* C600 с частотой  $1 \cdot 10^{-4}$  на реципиентную клетку появлялись колонии *E. coli*, устойчивые к хлорамфениколу. Скрининг плазмидной ДНК из полученных трансконъюгативных колоний *E. coli* показал наличие плазмидной ДНК в проверенных клонах. В каждом проанализированном клоне *E. coli* C600(pSa') плазмидная ДНК находилась в нескольких топологически различных формах, отличающихся электрофоретической подвижностью. Данное явление не наблюдалось при конъюгативном переносе плазмиды pSa между различными штаммами *E. coli*.

Плаزمида pSa', в отличие от плазмиды pSa, приобрела способность не только реплицироваться в клетках *F. tularensis*, но и трансформировать туляремийный микроб. При электропорации 1 мкг ДНК плазмиды pSa', выделенной из штамма *F. tularensis* 15(pSa'), в клетки *F. tularensis* 15 было получено 1360 трансформантов. В случае же электропорации бактерий плазмидой pSa не было получено ни одного трансформанта. Как и в случае межродового скрещивания, каждый образец плазмидной ДНК pSa' из трансформационных клонов имел по одной плазмидной полосе, отличающихся между собой по электрофоретической подвижности.

Частота конъюгативного переноса плазмиды pSa' из *E. coli* C600(pSa') в *F. tularensis* 15 составляла  $5 \cdot 10^{-4}$  на клетку реципиента, что существенно выше частоты переноса плазмиды pSa. При использовании в качестве реципиента бактерии *F. tularensis* 15R, имеющей клеточную стенку с редуцированным ЛПС, частота переноса плазмиды pSa' составляла около  $8 \cdot 10^{-4}$  на реципиентную клетку, что несущественно отличается от данных для штамма *F. tularensis* 15, имеющего SR-тип колоний.

Эффективность конъюгативного переноса плазмиды pSa' из клеток *E. coli* C600(pSa') в клетки *F. tularensis* 15, а также обратный перенос из клеток *F. tularensis* 15(pSa') в клетки *E. coli* C600 зависит от состава среды, на которой происходит скрещивание, и температуры инкубации конъюгационной смеси. Перенос плазмиды pSa' из клеток *E. coli* C600(pSa') в клетки *F. tularensis* 15 наблюдался нами только при температуре 25 °С, но не при 37 °С. Среда LA является более предпочтительной при прямом переносе, чем среда ТА. Обратный перенос плазмиды pSa' из клеток *F. tularensis* в клетки *E. coli* происходит с большей частотой также на среде LA. Температура обратного скрещивания (37 °С) более оптимальна, чем 25 °С.

Конъюгативный перенос плазмиды pSa' между клетками *F. tularensis* происходил с частотой  $2 \cdot 10^{-10}$ . Данная величина существенно ниже, чем частота переноса плазмиды pSa' из *F. tularensis* в *E. coli*. При пассировании штамма *F. tularensis* 15(pSa') через беспородных белых мышей было показано, что величина обсемененности селезенки не отличалась от исходного штамма *F. tularensis* 15 и составляла около  $1 \cdot 10^5$  КОЕ на орган, однако выделяемая культура *F. tularensis* была чувствительна к хлорамфениколу и ее клетки, по данным электрофореза, не содержали плазмидную ДНК.

Проведенные эксперименты показали, что плазида pSa модифицируется при первичном переходе в клетки туляремиального микроба, приобретая способность реплицироваться в этих клетках. Полученные результаты не подтверждают предположение, сделанное в работе А.П.Померанцева и соавт. [3] о необходимости дополнительных генетических элементов (плунжерной плазмиды) для межродового переноса плазмиды pSa в клетки *F. tularensis*. Исходя из того, что частота повторного переноса плазмиды pSa' в клетки туляремиального микроба возрастает на три порядка, по сравнению с первоначальной частотой переноса плазмиды pSa, можно сделать предположение, что модификация плазмиды происходит с частотой около  $10^{-3}$ , и данный процесс осуществляется в клетках *F. tularensis*. В пользу этого свидетельствует то, что при первичном конъюгативном переносе плазмиды pSa на селективных чашках колонии конъюгантов *F. tularensis* появляются начиная с 72 ч инкубации, и затем их количество увеличивается вплоть до 192 ч инкубации, а при переносе модифицированной плазмиды pSa' из клеток *E. coli* в клетки *F. tularensis* практически все колонии трансконъюгантов вырастают через 72 ч.

На эффективность конъюгативного переноса плазмиды pSa' из клеток *E. coli* в клетки туляремиального микроба практически не влияет тип культуры *F. tularensis* (SR или R).

Особенностью препаратов плазмиды pSa', выделенных из изолированных колоний трансконъюгантов *F. tularensis*, является их различная электрофоретическая подвижность в агарозном геле, что может быть объяснено разным количеством супервитков в кольцевой молекуле ДНК, возможно, являющихся следствием встраивания в плазмиду коротких АТ-богатых фрагментов ДНК из хромосомы туляремиального микроба. При попадании такой плазмиды в клетку *E. coli*, возможно, происходят внутримолекулярные рекомбинации в этих плазмидах, приводящие к появлению целого спектра относительно устойчивых форм плазмиды. Такие плазмиды практически не отличаются по размерам, но обладают разной степенью суперспирализации и, соответственно, различной электрофоретической подвижностью.

Плазида pSa' при попадании в клетки туляремиального микроба вызывает изменения их микробиологических и биологических свойств. Штамм *F. tularensis* 15(pSa') крайне нестабилен при пассировании через белых мышей, и в процессе размножения ис-

ходная популяция клеток замещается бесплазмидными сегрегантами.

Благодаря высокой пластичности плазмиды pSa модификация репликативной машины этой плазмиды в клетках туляремиального микроба происходит с довольно высокой частотой. Интересно отметить, что оперон *tra* плазмиды pSa функционально активен в клетках туляремиального микроба.

Проведенные эксперименты по успешному переносу плазмиды pSa в туляремиальный микроб позволяют сделать предположение о том, что подобные процессы могут происходить и с другими конъюгативными плазмидами, тем самым ускоряя эволюцию возбудителя туляремии и его адаптацию к меняющейся среде обитания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаев И.В., Асташкин Е.И., Пачкунов Д.М., Стагис И.И., Шитов В.Т., Светоч Э.А. *Pseudomonas mallei* и *Pseudomonas pseudomallei*: введение и поддержание природных и рекомбинантных плазмидных репликонов. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1995; 1:28–36.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.
3. Померанцев А.П., Домарадский И.В., Шишкова Н.А. Гибридная плазида pSKFT5 обеспечивает перенос плазмиды Sa из клеток *Escherichia coli* в клетки вакцинного штамма туляремиального микроба. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 1991; 8: 13–6.
4. Farrand S.K., Kado C.I., Ireland C.R. Suppression of tumorigenicity by the IncW R plasmid pSa in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 1981; 181(1):44–51.
5. Ireland C.R. Detailed restriction enzyme map of crown gall-suppressive IncW plasmid pSa, showing ends of deletion causing chloramphenicol sensitivity. J. Bacteriol. 1983; 155:722–7.
6. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like 6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:253–6.
7. Rigby C.E., Fraser A.D. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. Can. J. Vet. Res. 1989; 53(3):326–30.
8. Watanabe T., Furuse C., Sakaizumi S. Transduction of various R factors by phage P1 in *Escherichia coli* and by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 1968, 96:1791–5.

#### References

1. Abaev I.V., Astashkin E.I., Pachkunov D.M., Stagis I.I., Shitov V.T., Svetoch E.A. [*Pseudomonas mallei* and *Pseudomonas pseudomallei*: introduction and maintenance of natural and recombinant plasmid replicons]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 1995; 1:28–36.
2. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Gene-Engineering. Molecular Cloning]. M.: Mir; 1984. 479 p.
3. Pomerantsev A.P., Domaradsky I.V., Shishkova N.A. [Hybrid pSKFT5 plasmid provides for Sa plasmid transfer from *Escherichia coli* cells into the vaccine strain of tularemia microbe]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 1991; 8:13–6.
4. Farrand S.K., Kado C.I., Ireland C.R. Suppression of tumorigenicity by the IncW R plasmid pSa in *Agrobacterium tumefaciens*. Mol. Gen. Genet. 1981; 181(1):44–51.
5. Ireland C.R. Detailed restriction enzyme map of crown gall-suppressive IncW plasmid pSa, showing ends of deletion causing chloramphenicol sensitivity. J. Bacteriol. 1983; 155:722–7.
6. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like 6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:253–6.
7. Rigby C.E., Fraser A.D. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. Can. J. Vet. Res. 1989; 53(3):326–30.
8. Watanabe T., Furuse C., Sakaizumi S. Transduction of various R factors by phage P1 in *Escherichia coli* and by phage P22 in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 1968, 96:1791–5.

#### Authors:

Mokrievich A.N., Shishkova N.A., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Мокриевич А.Н., Шишкова Н.А., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 02.10.12.