

А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Р.И.Миронова, Т.И.Комбарова, Г.М.Титарева, Т.Б.Кравченко,
И.В.Бахтеева, И.А.Дятлов, В.М.Павлов

СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ ВАКЦИННОГО ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* БЕЗ ГЕНОВ *iglC*. Сообщение 1

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболensk,
Российская Федерация

Получены варианты вакцинного штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 с делетированными генами *iglC*. Показано, что в геноме штамма 15 содержится две копии гена *iglC*. Удаление одной копии гена практически не влияет на культурально-морфологические и ростовые свойства микроба. Бактерии без одной копии гена *iglC* размножаются в мышинных макрофагах медленнее по сравнению с исходным штаммом, в то время как инактивация двух копий гена *iglC* в штамме 15 приводит к полной потере способности размножаться в макрофагах.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, аллельный обмен, ген *iglC*, фагоцитоз.

A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, R.I.Mironova, T.I.Kombarova, G.M.Titareva, T.B.Kravchenko,
I.V.Bakhteeva, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

Construction and Investigation of the Vaccine Strain *Francisella tularensis* without *iglC* genes. Communication 1

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

Using site-specific mutagenesis constructed were the variants of the vaccine strain *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 with the deleted *iglC* genes. Identified was the fact that genome of the strain 15 contained two copies of *iglC* gene. Deletion of one of them as well as both had little effect on the cultural-morphological and growth properties of the microbe. At the same time *F. tularensis* 15 lacking one copy of the *iglC* gene propagated in mice macrophages several times slower, than the original strain. Inactivation of both of the copies in the chromosome led to the emergence of a variant incapable of intracellular reproduction. This capacity in *F. tularensis* 15/23-2 with two inactivated *iglC* gene copies was partially recovered after integration of a complementing plasmid. Therewith the data mentioned above testifies to the significance of *iglC* gene for the process of reproduction in macrophages.

Key words: *Francisella tularensis*, allele translocation, *iglC* gene, phagocytosis.

Возбудитель туляремииной инфекции *Francisella tularensis* является внутриклеточным паразитом и способен размножаться в широком спектре эукариотических клеток [12]. Для внутриклеточного паразитирования бактерии *F. tularensis* содержат целый комплекс белков, кодируемых генами, расположенными на острове патогенности (ТОП – туляремииной остров патогенности, или FPI – Francisella Pathogenicity Island). Одним из ключевых генов этого региона является ген *iglC*. Белок размером 23 кДа, кодируемый геном *iglC*, начинает интенсивно накапливаться в бактериальных клетках при попадании туляремииного микроба в макрофаги [6].

Разработанный нами ранее метод сайт-направленного мутагенеза *F. tularensis* позволил показать, что в геноме штамма LVS содержатся две копии гена *iglC* [7], что впоследствии было подтверждено прямым секвенированием полного генома штамма *F. tularensis* LVS [10]. Штамм LVS (Live Vaccine Strain) был отобран в США из изолированных колоний при расसेве лиофильно высушенных бактерий *F. tularensis* штаммов 15 и 155, переданных из СССР [5]. Анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *F. tularensis* Schu и LVS показал, что в них присутствуют не только две копии гена *iglC*, но и две копии ТОП. Штамм LVS без двух копий гена

iglC практически не размножается в макрофагах [7], однако, в литературе отсутствуют данные о влиянии делеции гена *iglC* в геноме вакцинного штамма *F. tularensis* 15 на его способность индуцировать протективный иммунитет.

Целью данной работы являлось получение вариантов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 с делетированными одной и двумя копиями гена *iglC* и изучение их иммунобиологических свойств.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и плазмиды. Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице.

Праймеры для контроля за определением участка интеграции плазмиды pPVΔ*iglC* в хромосому *F. tularensis*: для встраивания перед геном *iglC* – 23SalL25 5'-ACGCGTTCGACAAACACTAATAAAGC C-3' и 23SalR15 5'-GCGTGTTCGACTTAGCCGTGCC AATTACCA -3'; для встраивания после гена *iglC* – 23SalL15 5'-ACGCGTTCGACTACAATGCTAGAAAC CTT-3' и 23SalR25 5'-GCGTGTTCGACACAAGAAGC TGCTAATGCT-3' [7].

Условия культивирования. Штаммы *E. coli* выращивали при температуре 37 °C на плотной и жид-

Бактериальные штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник или ссылка
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»
<i>F. tularensis</i> 15/23-1	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с инактивированной одной копией гена <i>iglC</i>	Данная работа
<i>F. tularensis</i> 15/23-2	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ с инактивированными двумя копиями гена <i>iglC</i>	Данная работа
<i>F. tularensis</i> 15/23-2com	<i>F. tularensis</i> 15/23-2 с интегрированной плазмидой pHV33' <i>iglC</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17-1 <i>λpir</i>	(<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i> RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7(Tr ^R Sm ^R)); лизогенное производное S17-1, продуцирующее π-белок, необходимый для репликации плазмид, содержащих <i>ori6K</i>	«ГКПМ-Оболенск» [11]
<i>E. coli</i> S17(pPV)	Производный штамма S17-1 <i>λpir</i> , содержащий плазмиду pPV, Amp ^R , Cm ^R	«ГКПМ-Оболенск» [7]
<i>E. coli</i> S17(pPVΔ <i>iglC</i>)	Производный штамма S17-1 <i>λpir</i> , содержащий плазмиду pPVΔ23, Amp ^R , Cm ^R	«ГКПМ-Оболенск» [7]
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F. (φ80dlacZAM15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169</i>	«ГКПМ-Оболенск» [13]
<i>E. coli</i> DH5α(pHV33')	Производный штамма DH5α, содержащий плазмиду pHV33', Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R	Данная работа
<i>E. coli</i> DH5α(pHV33' <i>iglC</i>)	Производный штамма DH5α, содержащий плазмиду pHV33' <i>iglC</i> , Amp ^R , Cm ^R , Tc ^S	Данная работа
pPVΔ <i>iglC</i>	Amp ^R , Cm ^R , sacB, mob, 3.0 п.о. область генома <i>F. tularensis</i> 15 с делецией в гене <i>iglC</i>	[7]
pHV33'	Фенотип в <i>E. coli</i> Amp ^R , Cm ^R , Tc ^R	Данная работа
pHV33' <i>iglC</i>	Фенотип в <i>E. coli</i> Amp ^R , Cm ^R , Tc ^S 3.6 п.о. область генома <i>F. tularensis</i> 15 с геном <i>iglC</i>	Данная работа

кой питательной среде Лурия–Бертани (ЛБ) [3], при необходимости в присутствии антибиотиков (100 мкг/мл ампициллина или 20 мкг/мл хлорамфеникола). Штаммы *F. tularensis* выращивали при температуре 37 °С на плотной (FTA) и жидкой (FTB) питательной среде. Состав FTA: 3,8 % эритрит-агар, 1 % высушенная кровь крупного рогатого скота, 1 % глюкоза, 0,05 % цистеин, 0,0025 % тиамин хлорид, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), Состав FTB [1]: 2 % ферментативный гидролизат казеина, 1 % дрожжевой экстракт, 1,2 % K₂HPO₄, 1 % глюкоза, 0,001 % цистеин, 0,001 % FeCl₂, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). При необходимости в среду добавляли 100 мкг/мл полимиксина В и 3 мкг/мл хлорамфеникола.

Выделение ДНК. Выделение плазмидных ДНК из клеток *E. coli* проводили по методике, изложенной в работе [2]. Выделение ДНК из клеток *F. tularensis* выполняли, как описано ранее [8].

Межвидовая конъюгация. Перенос плазмид из клеток *E. coli* S17-1(pPVΔ*iglC*) в клетки *F. tularensis* проводили методом межвидового скрещивания, как описано ранее [7], с рядом модификаций. 50 мкл суспензии донорного штамма *E. coli* S17-1(pPVΔ*iglC*) (1·10⁸ клеток) смешивали с 50 мкл реципиентного штамма *F. tularensis* (3·10¹⁰ клеток) и полученную смесь наносили пятнами на агар ЛБ. Скрещивание проводили при температуре 25 °С в течение 18 ч. Подросткую бактериальную культуру суспендировали в забуференном физиологическом растворе, pH 7,2 (ЗФР). Высев конъюгантов проводили на плотную питательную среду FTA, содержащую 100 мкг/мл полимиксина В для контрселекции донорного штамма *E. coli* и 3 мкг/мл хлорамфеникола, и инкубировали при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 120 ч.

Аллельный обмен. Конъюгант *F. tularensis* с интегрированной плазмидой pPVΔ*iglC* суспендировали в

ЗФР до концентрации 5·10⁹ м.к./мл, титровали с шагом 10 до седьмого разведения и высевали по 0,2 мл из каждого разведения на среду FTA, содержащую 100 мкг/мл полимиксина В и 5 % сахарозы. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. Среди клонов с фенотипом Suc^R отбирали варианты с фенотипом Cm^SSuc^R на среде FTA, содержащей 100 мкг/мл полимиксина В и 5 % сахарозы. Методом ПЦР среди клонов Cm^SSuc^R отбирались варианты *F. tularensis* с делецией в одном или двух генах *iglC*. Для проведения ПЦР использовали проверочные праймеры: 23CF – 5'-AAGGATAAGACCTGTCTG-3' и 23 CR – 5'-TTGAAACCATAACCGGGTA-3'.

Комплементация. Для комплементации гена *iglC* в мутантном штамме *F. tularensis* была создана плазида pHV33'*iglC*, состоящая из вектора pHV33' (делеционное производное плазмиды pHV33 [4]) и ампликона, содержащего фланкированный ~1,5 т.п.о. участками хромосомной ДНК *F. tularensis* нативный ген *iglC* (629 п.о.). Ампликон размером 3558 п.о. был получен с помощью праймеров 23SalL15 и 23SalR15 на матрице штамма *F. tularensis* 15. Ампликон был встроен в *SalI* сайт плазмиды pHV33'. В результате электропорации плазмиды pHV33'*iglC* был получен штамм *E. coli* DH5α(pHV33'*iglC*).

Клоны, содержащие плазмиду, имели фенотип Ap^RCm^RTc^S. Препарат ДНК pHV33'*iglC*, выделенный из клеток *E. coli*, переносили методом электропорации [9] в клетки *F. tularensis* с целью аллельного замещения одного из делетированных генов *iglC* на интактный вариант.

Фагоцитоз. В работе использовали клетки линии J774A.1 (полученные из Российской Коллекции Клеточных Культур) и перитонеальные макрофаги, выделенные из мышей линии BALB/c. Макрофаги (J774A.1 или перитонеальные) вносили в 24-луночные планшеты для клеточных культур (Costar) в концентрации 10⁵ клеток в лунку и инкубировали в

полной питательной среде Dulbecco Eagle (10 % фетальной сыворотки теленка, 2 мМ глутамин), при температуре 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂ и 100 % влажности в течение 24 ч. Бактериальные суспензии *F. tularensis*, мутантных и исходных штаммов, вносили в лунки с монослоем макрофагов в соотношении 100:1 и выдерживали при температуре 37 °С и 5 % CO₂ в течение 2 ч. От внеклеточных бактерий освобождались, добавляя в культуральную среду 2 мкг/мл гентамицина на 1 ч. Для определения количества бактерий, захваченных макрофагами, через 3 ч после внесения бактерий в лунки добавляли по 0,5 мл 0,05 % раствора дезоксихолата натрия, чтобы лизировать макрофаги. Через 15 мин из лизатов делали высевы на среду ФТА. Ту же операцию повторяли через 24 и 48 ч инкубирования бактерий с макрофагами. Подсчет числа живых клеток после посева проводили через 72 ч инкубации при температуре 37 °С. Эффективность размножения оценивали по десятичным логарифмам количества колоний, полученных при высеве лизатов макрофагов через 3, 24 и 48 ч после инфицирования штаммами *F. tularensis*.

Устойчивость к действию нормальной кроличьей сыворотки (НКС). Нормальную кроличью сыворотку получали по стандартной методике, разделяли на аликвоты и хранили при температуре -18 °С. Из свежей агаровой культуры готовили суспензию клеток в 3ФР, с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП).

Микробные клетки вносили в неразведенную сыворотку до концентрации 2·10⁶ м.к./мл (1/10 часть клеточной суспензии от конечного объема) и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Концентрацию выживших клеток определяли высевом из соответствующих разведений на среду ФТА, содержащую 100 мкг/мл полимиксина В.

Результаты и обсуждение

Ранее нами был разработан метод аллельного обмена в геноме туляреминого микроба [7]. Применение данного метода для делеции гена *iglC* в геноме *F. tularensis* LVS позволило не только получить варианты штамма *F. tularensis* LVS без гена *iglC*, но и показать, что в хромосоме штамма LVS содержатся две копии гена *iglC* [7]. Применение метода аллельного обмена позволило нам получить также два варианта штамма *F. tularensis* 15: *F. tularensis* 15/23-1 – с одной инактивированной копией гена *iglC* и *F. tularensis* 15/23-2 – двумя инактивированными копиями гена *iglC*. На присутствие двух копий гена *iglC* в штамме 15 указывает тот факт, что в штамме 15/23-1 ПЦР анализ с помощью проверочных праймеров 23CF и 23CR выявляет два ампликона размерами ~990 и ~450 п.о., тогда как в штамме 15/23-2 – только ампликон ~450 п.о. (рис. 1).

Для изучения влияния гена *iglC* на микробиологические и иммунологические свойства туляреминого микроба, нами была проведена комплементация

инактивированного гена *iglC* в штамме *F. tularensis* 15/23-2. Для этой цели была использована плазмида pHV33'*iglC*, созданная на основе бактериального вектора pHV33'. Особенностью плазмиды pHV33' является то, что ее можно вводить в клетки туляреминого микроба методами криотрансформации или электропорации, но она крайне нестабильна в этих клетках, вероятно, из-за низкой скорости репликации. Частота интеграции плазмиды pHV33'*iglC* в хромосому штамма *F. tularensis* 15/23-2 при электропорации составляла 4·10⁻⁴ (4 клон на 10⁴ трансформантов). Клоны с интегрированной плазмидой отличались от клонов с автономной плазмидой размером колоний и способностью к пересеву: единичные крупные колонии среди микроколоний, хорошо растущие при пересеве на среду с хлорамфениколом. Клоны с фенотипом Cm^R были проверены в ПЦР с использованием клонирующих праймеров 23SalL15 и 23SalR15. Комплементированные клоны давали синтез двух ампликонов размером 3,0 и 3,6 т.п.о., что соответствует наличию в геноме как делетированного, так и интактного вариантов гена *iglC*. Один из отобранных клонов был обозначен как штамм *F. tularensis* 15/23-2com. При электрофоретическом анализе в ПААГ-SDS геле лизатов клеток штамма *F. tularensis* 15/23-2-com выявлено усиление интенсивности окраски полосы, соответствующей по подвижности белку с молекулярной массой 23 кДа (т.е. молекулярной массе белка IglC) по сравнению с полосой штамма *F. tularensis* 15/23-2 (данные не приведены).

При выращивании на плотной питательной среде ФТА штаммов *F. tularensis* 15 и вариантов с одной и двумя делетированными копиями гена *iglC* видимых отличий в скорости роста и морфологии колоний отмечено не было. Также не были отмечены различия в динамике роста бактерий при культивировании на жидкой питательной среде ФТВ. Время удвоения клеток составляло около 2 ч и лимитировалось содержанием кислорода в культуральной среде.

Инактивация одной и двух копий гена *iglC* в геноме вакцинного штамма туляреминого микроба не изменила его способности сохранять жизнеспособность в НКС по сравнению с исходным штаммом, свидетельствуя о том, что внесенной мутацией не

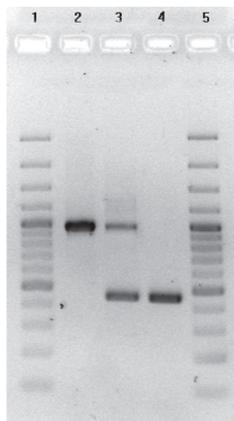


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов, полученных с праймерами 23CL и 23CR и ДНК штаммов *F. tularensis*: 2 – *F. tularensis* 15; 3 – *F. tularensis* 15/23-1; 4 – *F. tularensis* 15/23-2; 1, 5 – маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, Литва)

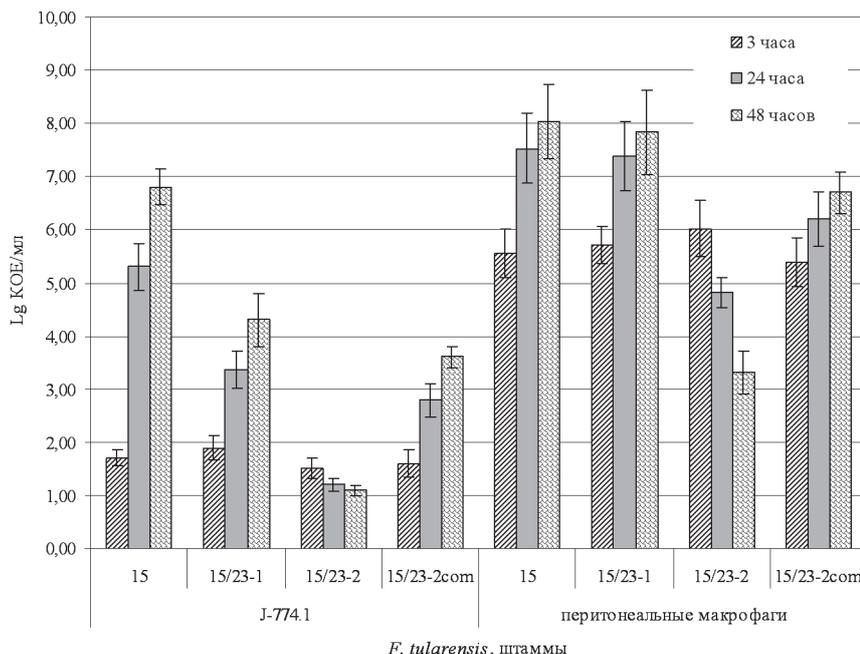


Рис. 2. Влияние гена *iglC* *F. tularensis* на процесс фагоцитоза на моделях макрофагоподобных клеток линии J774.1A и перитонеальных макрофагах мышей линии BALB/c. Макрофаги инфицировались в соотношении 100:1, количество бактерий в макрофагах определялось через 3, 24 и 48 ч после инфицирования; результаты показаны как значение Lg КОЕ/мл \pm доверительный интервал ($p < 0,05$) по результатам трех независимых экспериментов

были затронуты молекулярные структуры, обеспечивающие устойчивость туляремийного микроба к бактерицидным свойствам сыворотки.

Поскольку в хромосоме штамма *F. tularensis* LVS были выявлены две копии гена *iglC* и было показано, что модифицированные штаммы LVS без одной и двух копий гена *iglC* по-разному размножались в макрофагах [7], то нам представлялось интересным изучить влияние данной мутации на способность штамма *F. tularensis* 15 захватываться, выживать и размножаться в клетках линии J774.1A и перитонеальных макрофагах. С этой целью клеточные линии J774.1A и перитонеальные макрофаги были инфицированы штаммами *F. tularensis* 15, 15/23-1, 15/23-2 и 15/23-2com и через 24 и 48 ч было определено количество живых микробных клеток, находящихся в макрофагах (рис. 2).

Данные диаграммы показывают, что вакцинный штамм без одной копии гена *iglC* размножался в клетках J774.1A в 8–10 раз хуже, чем исходный штамм. Инактивация обеих копий гена *iglC* в хромосоме *F. tularensis* 15 привела к появлению варианта, неспособного к внутриклеточному размножению. Способность к внутриклеточному размножению варианта *F. tularensis* 15/23-2 с двумя инактивированными копиями гена *iglC* была частично восстановлена после введения комплементирующей плазмиды, что свидетельствует о важной роли гена *iglC* в процессе размножения в макрофагах (рис. 2).

Для перитонеальных макрофагов был характерен более активный захват бактериальных клеток по сравнению с макрофагоподобными клетками J774.1A, на что указывают результаты высевов бактерий из макрофагов через 3 ч после инфицирования (рис. 2). Скорость размножения штаммов *F. tularensis* 15 и *F. tularensis* 15/23-1 в перитонеальных макрофагах через 24 и 48 ч практически не отличалась. Вакцинный штамм без генов *iglC* не размножался в

макрофагах.

Полученные данные подтверждают ранее сделанный вывод о важности гена *iglC* для внутримакрофагального размножения штамма LVS и на примере вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ланин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домошенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):66–7.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир; 1976. 440 с.
4. Ehrlich S.D. DNA cloning in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978; 75:1433–6.
5. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(4):631–46.
6. Golovliov I., Ericsson M., Sandström G., Tärnvik A., Sjöstedt A. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. Infect Immun. 1997; 65(6):2183–9.
7. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 222:273–80.
8. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1996; 13:253–56.
9. Pomerantsev A.P., Golovliov I.R., Ohara Y., Mokrievich A.N., Obuchi M., Norqvist A., Kuoppa K., Pavlov V.M. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. Plasmid. 2001; 46(3):210–22.
10. Rohmer L., Brittmacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M., Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential Source of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Attenuation Determined by Genome Comparison. Infect. Immun. 2006; 74(12):6895–906.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology. 1983; 1:784–91.
12. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann. NY Acad. Sci. 2007; 1105:1–29.
13. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. 1989; 17:3469–78.

References

1. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khranov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; (102):66–7.
2. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook G. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. M.: Mir; 1984. 479 p.
3. Miller D. [Experimentation in Molecular Genetics]. M.: Mir; 1976. 440 p.
4. Ehrlich S.D. DNA cloning in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75:1433–6.
5. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., Titball R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15(4):631–46.
6. Golovliov I., Ericsson M., Sandström G., Tärnvik A., Sjöstedt A. Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect Immun.* 1997; 65(6):2183–9.
7. Golovliov I., Sjöstedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 222:273–80.
8. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 13:253–56.
9. Pomerantsev A.P., Golovliov I.R., Ohara Y., Mokrievich A.N., Obuchi M., Norqvist A., Kuoppa K., Pavlov V.M. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. *Plasmid.* 2001; 46(3):210–22.
10. Rohmer L., Brittnacher M., Svensson K., Buckley D., Haugen E., Zhou Y., Chang J., Levy R., Hayden H., Forsman M., Olson M., Johansson A., Kaul R., Miller S.I. Potential Source of *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Attenuation Determined by Genome Comparison. *Infect. Immun.* 2006; 74(12):6895–906.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Biotechnology.* 1983; 1:784–91.
12. Sjöstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. NY Acad. Sci.* 2007; 1105:1–29.
13. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:3469–78.

Authors:

Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Mironova R.I., Kombarova T.I., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., 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., Вахрамеева Г.М., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 03.06.13.