

Т.Е. Горб¹, А.И. Кушкина¹, Т.В. Иваница², Т.Г. Лысенко¹, Ф.И. Товкач¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

² Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65029, Украина

СТРУКТУРНАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ДНК ТРАНСПОЗОННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАЗМИДЫ pCA25

В исследовании использовали устойчивые к митомицину С, налидиксовой кислоте и стрептомицину мутанты *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48А, несущие плазмиду pCA25 и ее транспозонный вариант. Показано, что наличие транспозона в плазмиде pCA25 (штамм 48А-7/4b [pCA25::Tn9]) фактически не влияет на частоту возникновения устойчивых бактериальных мутантов при воздействии всех трех антибиотиков. Только в случае клонов этого штамма, устойчивых к митомицину С, было обнаружено несколько вариантов, плазмидный профиль которых отличается от исходного. Электрофоретическая подвижность плазмидной ДНК мутантных клонов 31 и 32 уменьшалась и приближалась к подвижности исходной плазмиды pCA25, мутантная плазида 13 имела увеличенную электрофоретическую подвижность по сравнению с pCA25::Tn9. Некоторые плазмиды являются делеционными вариантами pCA25::Tn9, у которых отсутствует один из двух IS1-элементов транспозона Tn9. Полученные результаты указывают на то, что исследуемая плазида pCA25 является стабильной, не элиминируется из клеток при различных обработках, и еще раз подтверждают гипотезу о ее профаговом происхождении.

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, плазида pCA25, транспозон Tn9, рестрикционный анализ ДНК.

Фитопатогенная бактерия *Erwinia carotovora* содержит большое разнообразие внехромосомных генетических элементов. Наиболее распространенная среди них группа включает гомологичные плазмиды размером 9,8 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.), к числу которых принадлежит и плазида pCA25 из штамма *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 48А [8].

Плазида pCA25 является хорошо изученным генетическим элементом бактерии *Ecc* 48А. Проведено ее рестрикционное картирование, создана физическая карта сайтов, а также осуществлена инкорпорация транспозона Tn9 в ДНК этой плазмиды [6, 7]. Однако до сих пор не было выявлено ни одного фенотипического признака, который могла бы кодировать плазида pCA25. Одним из способов изучения физиологии и генетики плазмид является использование транспозонного мутагенеза с одновременной физической локализацией искусственно внесенного сайта рестрикции ДНК. Было показано, что бактериофаг P1 не только способен к трансдукции *E. carotovora*, но и может быть источником транспозона Tn9, несущего ген устойчивости к хлорамфениколу [3]. Было обнаружено, что транспозон Tn9 встраивается только в определенный локус на плазмиде pCA25 и стабильно наследуется клетками штамма *Ecc* 48А (например, *Ecc* 48А-7/4b [pCA25::Tn9] [2]).

Исходя из того, что плазида pCA25::Tn9 несет удобный селективный маркер устойчивости к хлорамфениколу, появилась возможность излечить штамм *Ecc* 48А от плазмиды. Однако в результате различных обработок (при применении 1 % SDS, с помощью повышенной температуры или обработки этидией бромидом) не удалось избавиться от плазмиды pCA25 [2].

Цель настоящей работы состояла в исследовании структурной стабильности ДНК плазмиды pCA25 и ее транспозонных производных.

Материалы и методы. Основным объектом данного исследования был штамм *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48А, несущий аутентичную плазмиду pCA25, размером 9,8 т.п.н. Его изогенный вариант, штамм 7/4b, несущий плазмиду pCA25::Tn9, выступал в качестве основного модельного объекта для изучения структурной стабильности плазмидных ДНК, несущих Tn9.

Культивирование бактерий производили в LB-бульоне и на LB-агаре [5], а также на агаризованной среде А [5] с 1 % пектином (АП) и 0,2 % лактозой (АЛ) при 28 °С.

© Т.Е. Горб, А.И. Кушкина, Т.В. Иваница, Т.Г. Лысенко, Ф.И. Товкач, 2011

Рабочие концентрации антибиотиков составляли: хлорамфеникола (Сm) – 100 мкг/мл, митомицина С (МС) – 0,5 мкг/мл, налидиксовой кислоты (Nal) – 20 мкг/мл, стрептомицина (Str) – 25-50 мкг/мл.

Для получения устойчивых к антибиотикам клонов ночную культуру клеток штамма *Ecc* 48A [pCA25] и 48A–7/4b [pCA25::Tn9] выращивали в LB-бульоне с аэрацией. Клетки отмывали на микроцентрифуге ELM1 при 10000 об/мин на протяжении 5 мин, растворяли в свежем LB-бульоне, затем рассеивали на LB-чашки с соответствующим антибиотиком. Титр клеточной суспензии определяли на чашках LB без антибиотика. Чашки инкубировали 2–3 суток при температуре 28 °С. Устойчивые колонии трижды клонировали на среде с соответствующим антибиотиком.

Методы выделения плазмидных ДНК и их рестрикционный анализ описаны в предыдущих сообщениях [2, 7, 8].

Результаты и их обсуждение. Общеизвестно, что механизм действия налидиксовой кислоты состоит в ингибировании ключевого фермента бактерий – ДНК-гиразы, определяющего процесс биосинтеза ДНК и деления клетки. Антибиотик стрептомицин – ингибитор трансляции, подавляет белковый синтез на рибосомном уровне. Мутации устойчивости Str приводят к изменению структуры рибосом и снижению проницаемости внешних структур микробной клетки. И, наконец, механизм действия митомицина С связан с образованием поперечных сшивок между нитями ДНК и угнетением ее синтеза, что влечет за собой широкомасштабный SOS-ответ [1, 12, 14].

Используя для мутагенеза эти три антибиотика, мы отбирали устойчивые к ним бактерии – по 50 клонов, устойчивых к налидиксовой кислоте и митомицину С и 10 устойчивых клонов к стрептомицину. Дальнейшую селекцию и определение плазмидного спектра полученных мутантов проводили на среде с пектином (АП) и среде с лактозой (АЛ), на которых можно различить колонии, отличающиеся от исходных пектолитической активностью или колонии-диссоцианты, соответственно.

Известно, что частота возникновения устойчивых мутантов варьирует в зависимости от вида или штамма бактерий. Частота возникновения мутантов, устойчивых к налидиксовой кислоте штамма *Ecc* 48A, несущего исходную плазмиду pCA25, составляет $2,7 \times 10^{-8}$ (табл. 1) и близка к таковой для *Escherichia coli* (10^{-9}) [10, 12].

Таблица 1

Частота возникновения мутантов, устойчивых к митомицину С (МС^r), налидиксовой кислоте (Nal^r) и стрептомицину (Str^r) у штаммов *E. carotovora* 48A[pCA25] и 48A–7/4b [pCA25::Tn9]

Штамм	Частота МС ^r -мутантов (В/В ₀) (0,5мкг/мл)	Частота Nal ^r -мутантов (В/В ₀) (20 мкг/мл)	Частота Sm ^r -мутантов (В/В ₀) (25 мкг/мл)
48A(pCA25)	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-9}$
48A–7/4b(pCA25::Tn9)	$1,1 \times 10^{-5}$	$3,3 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-9}$

У *E. coli* частота мутаций Str^r составляет 10^{-9} , что хорошо согласуется с данными, полученными в этой работе – $2,6 \times 10^{-9}$ (табл. 1) [14], а частота образования МС^r-мутантов на 3–4 порядка выше по сравнению со значениями для стрептомицина и налидиксовой кислоты, соответственно [9].

Наличие транспозона в плазмиде pCA25 (штамм 48A–7/4b[pCA25::Tn9]) фактически не влияет на частоту возникновения устойчивых мутантов при воздействии всех трех антибиотиков (табл. 1).

Анализ роста мутантных клонов на средах АП и АЛ показал, что таковые, устойчивые к Nal и Str, не отличались от исходных штаммов. Только МС^r-клоны продемонстрировали большое разнообразие формы и размера колоний при росте на этих средах. Причем именно производные штамма, несущего меченую транспозоном Tn9 плазмиду – *Ecc* 48A–7/4b [pCA25::Tn9] – характеризовались слабым ростом на среде АП и АЛ. Таким образом, можно

предположить, что митомицин С оказывает наиболее существенное влияние на генетическую структуру ДНК, в том числе и на плазмиды рСА25 и рСА25::Tn9.

При анализе плазмидного состава мутантных клонов NaI^r и Str^r было установлено, что как исходная плазида рСА25, так и ее транспозонный вариант рСА25::Tn9 остаются стабильными и не элиминируются из клеток, т.е. соответствующие плазмидные профили не отличались от контрольных. Аналогично, неизменным оставался профиль у мутантных MC^r-клонов, несущих рСА25 (рис. 1).

Только в случае устойчивых к митомицину С клонов штамма с плазмидой рСА25::Tn9 было обнаружено несколько вариантов, плазмидный профиль которых отличается от исходного (рис. 1). Электрофоретическая подвижность плазмидной ДНК мутантных клонов 31 и 32 уменьшалась и приближалась к подвижности исходной плазмиды рСА25, что указывает на полную делецию транспозона. (рис. 1, дорожки 10 и 11). В то же время мутантная плазида 13 (рис. 1, дорожка 8) имела увеличенную электрофоретическую подвижность по сравнению с рСА25::Tn9. Это свидетельствует о наличии вставки в ее ДНК. И, наконец, некоторые клоны имели плазмидную ДНК с промежуточной подвижностью. Полоса этой плазмиды на электрофореze располагалась между исходной плазмидной ДНК и плазмидной ДНК с транспозоном. Этот вариант плазмиды был делеционным вариантом и его обозначили символом Δ (рис. 1, дорожки 3, 4, 5, 6). Эти делеционные варианты могут быть получены двумя способами: после культивирования *Ecc* 48A 7/4b в LB с 1 % SDS и повторной обработкой клеток, выживших после лизогенной индукции каротоворицинов MC у штамма 7/4b. С помощью рестрикционного анализа эндонуклеазами PstI, EcoRV и EcoRI было установлено, что данные плазмиды действительно являются делеционными вариантами рСА25::Tn9 [2]. Кроме того, делеция одного из двух IS1-элементов транспозона Tn9 является общеизвестным фактом и обнаружена во многих случаях [4, 13].

ДНК мутантных клонов 31 и 32 полностью теряет свой *EcoRV* фрагмент, что говорит о полном отсутствии транспозона Tn9 (рис. 2, дорожки 5 и 13).

Рестрикционный анализ ДНК мутанта 13 показал, что размер наибольшего фрагмента А *EcoRV* увеличился на 0,715 т.п.н. (рис. 3), свидетельствуя о наличии вставки в его ДНК, что не редко встречается у Tn9 [4].

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что исследуемая плазида рСА25 является стабильной, не элиминируется из клеток при различных обработках, и еще раз подтверждают гипотезу о профаговом происхождении указанной плазмиды.

Очевидно, для дальнейших исследований криптической плазмиды рСА25 необходимо провести ее транспозонный мутагенез с участием других общеизвестных транспозонов, в частности miniTn10 в составе плазмиды рLOF [11].

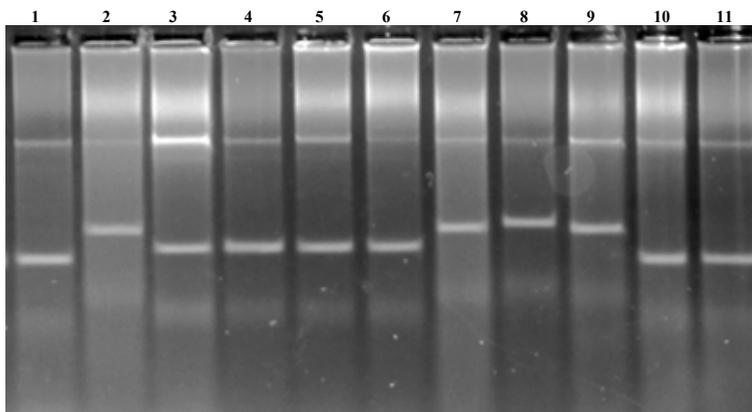


Рис. 1. Электрофореграмма плазмидной ДНК рСА25 и ее производных

- 1 – исходный штамм 48A [рСА25]; 2 и 7 – 48A - 7/4b [рСА25::Tn9];
3, 4, 5, 6 – плазмидные спектры делеционных вариантов 48A-7/4b [рСА25::ΔTn9];
8, 9, 10 и 11 – 48A-7/4b [рСА25::Tn9]MC^r

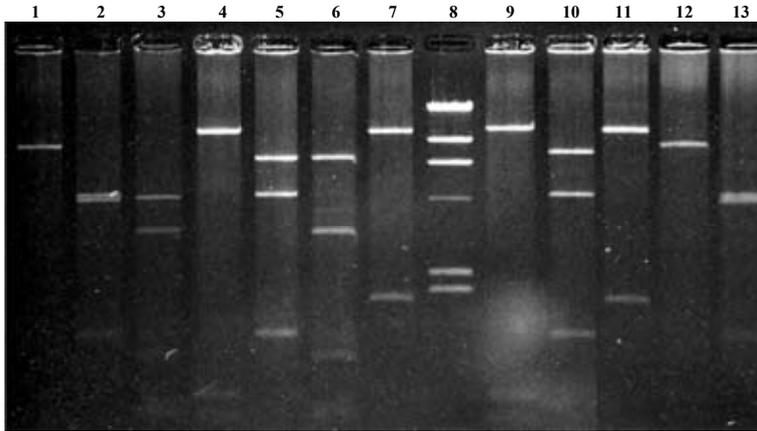


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов рестрикции Есс 48А-7/4bMC^r-клонів:

1, 2, 3 – плазмидная ДНК рСА25::Тn9, гидролизованная эндонуклеазами *HpaI*, *EcoRV* и *HpaI*+ *EcoRV* соответственно; 4, 5, 6, 7 – ДНК плазмиды рСА25::Тn9, гидролизованная рестриктазами *HpaI*, *EcoRV*, *HpaI*+ *EcoRV* и *PstI* соответственно; 9, 10, 11 – гидролиз ДНК плазмиды из штамма 48А-7/4b [рСА25::Тn9]MC^r –13 рестриктазами *HpaI*, *EcoRV* и *PstI*; 12, 13 – ДНК плазмиды 48А-7/4b [рСА25::Тn9]MC^r–31, гидролизованная рестриктазами *HpaI* и *EcoRV* соответственно, 8 – *HindIII*-фрагмент λ

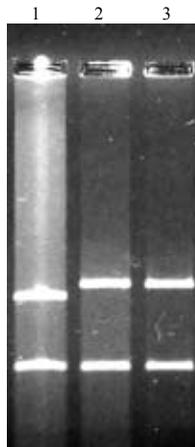


Рис. 3 – Рестрикционный анализ ДНК плазмиды 48А-7/4b (рСА25::Тn9) и мутанта 13 – с использованием рестриктазы *EcoRV*:

1 – 48А-7/4b; 2 и 3 – 48А-7/4b MC^r – клон 13

Горб Т.Ю.¹, Кушкіна А.І.¹, Іваниця Т.В.² Лисенко Т.Г.¹, Товкач Ф.І.¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

² Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова, Одеса

СТРУКТУРНА СТАБІЛЬНІСТЬ ДНК ТРАНСПОЗОННИХ ПОХІДНИХ ПЛАЗМІДИ СА25

Резюме

В дослідженні використовували стійкі до мітоміцину С, налідиксової кислоти і стрептоміцину мутанти *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48А, що несуть плазмиду рСА25 та її транспозонний варіант. Показано, що наявність транспозону в плазміді рСА25 (штам 48А-7/4b[рСА25::Тn9]) фактично не впливає на частоту виникнення стійких бактеріальних мутантів під дією всіх трьох антибіотиків. Тільки у випадку клонів цього штаму, стійких до мітоміцину С, було виявлено декілька варіантів, плазмідний профіль яких відрізняється від вихідного. Електрофоретична рухливість плазмідної ДНК мутантних клонів 31 і 32 зменшувалась і наближувалась до рухливості вихідної плазмиди рСА25, мутантна плазмідна 13 мала збільшену електрофоретичну рухливість порівняно з рСА25::Тn9. Деякі плазмиди є делеційними варіантами рСА25::Тn9, у яких відсутній один з двох IS1-елементів транспозону Тn9. Одержані результа-

ти вказують на те, що досліджувана плазміда pCA25 є стабільною, не елінується з клітин при різноманітній обробці, і ще раз підтверджує гіпотезу про її профагове походження.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, плазміда pCA25, транспозон Tn9, рестрикційний аналіз ДНК.

T.E.Gorb¹, A.I.Kushkina¹, T.V.Ivanytsa², T.G.Lysenko¹, F.I.Tovkach¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

² Mechnikov Odessa National University, Odessa

STRUCTURAL STABILITY OF DNA OF THE TRANSPOSON DERIVATIVES OF pCA25 PLASMID

S u m m a r y

Mutants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A carrying plasmid pCA25 and its transposon variant and resistant to mitomycin C, nalidixic acid and streptomycin were used in the research. It has been shown that the presence of transposon in plasmid pCA25 (strain 48A-7/4b[pCA25::Tn9]) does not practically affect the frequency of appearance of the stable bacterial mutants under the effect of all three antibiotics. Several variants, the plasmid profile of which differs from the initial one were found only in the case of this strain clones resistant to mitomycin C. Electrophoretic mobility of the plasmid DNA of the mutant clones 31 and 32 decreased and approached mobility of the initial plasmid pCA25, the mutant plasmid 13 had high electrophoretic mobility compared to pCA25::Tn9. Some plasmids are the deletion variants of pCA25::Tn9, one of two IS1-elements of the transposon Tn9 being absent in them. The obtained results indicate that the studied plasmid pCA25 is stable, is not eliminated from the cells under different treatments and confirm once more the hypothesis of the prophage origin of the plasmid.

The paper is presented in Russian.

К е y w o r d s: *Erwinia carotovora*, plasmid pCA25, transposon Tn9, restriction analysis of DNA.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Gorb T.E., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine

1. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. – М.: Мир, 1978. – 464 с.
2. Бурова Л.М., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Природа криптической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 23–28.
3. Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Экспрессия генов профара P1 *Escherichia coli* в клетках фитопатогенных эрвиний // Микробиол. журн. – 2006. – **68**, №2. – С. 39–47.
4. Данилевич В.Н., Алхимова Р.А., Ребеншиш Б.А., Суходолец В.В. Структура и стабильность коинтегрантных плазмид, опосредствованных элементами IS1 в составе транспозона ΔTn9 // Генетика. – 1990. – **26**, № 1. – С. 18–29.
5. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
6. Сергеева Ж.Ю., Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. – 2006. – **68**, № 4. – С. 34–39.
7. Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Рестрикционное картирование внехромосомного элемента pCA25 *Erwinia carotovora* // Микробиология і біотехнологія. – 2009. – № 2(6). – С. 66–68.
8. Товкач Ф.И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – Т.70, №6. – С. 804–810.
9. Товкач Ф.И., Горб Т.Е. Множественный характер мутаций устойчивости к митомцину С у *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Микробиол. журн. – 2005. – **67**, № 2. – С. 23–30.
10. Hane M.W., Wood T.H. *Escherichia coli* K-12 mutants resistant to nalidixic acid: genetic mapping and dominance studies // J. Bacteriol. – 1969. – V.99, N.1. – P. 238 – 241.
11. Herrero M., Lorenzo V., Timmis K.N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria // J. Bacteriol. – 1990. – V.172, N 11. – P. 6557 – 6567.
12. Pestova, E., Millichap, J. J., Noskin, G. A., Peterson, L. R. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – V 45, N 2. – P. 583 – 590.
13. Rosner J.L., Gottesman M.M. Transposition and deletion of Tn9 a transposable element carrying the gene for chloramphenicol resistance // In: DNA insertion elements, plasmids, and episomes/ Eds.: A.I. Bukhari, J.A.Shapiro, S.L. Adhia. – Cold Spring Harbor Laboratory, 1977. – P. 213 –217.
14. Springer B., Kidan Y.G., Prammananan T. et al. Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance // Antimicrobial Agents and Chemotherapy –2001. – V. 45, N 10. – p. 2877-2884.

Отримано 20.06.2010