

Всесоюзный ордена Трудового Красного Знамени  
научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб»

**ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ  
И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ  
МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

А.П. Анисимов, А.В. Карлышев, В.М. Павлов, В.И. Кравченко

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, СТАБИЛЬНО  
НАСЛЕДУЮЩИХСЯ В КЛЕТКАХ *YERSINIA PESTIS*

Оболенск

Развитие молекулярной генетики дает возможность в настоящее время при конструировании бактериальных вакцин использовать широкий спектр методов генной инженерии. Разрабатываются бивалентные

вакцины [2], конструируются токсоиды, способные секретироваться микробной клеткой и индуцировать наработку антитоксических  $\gamma$ -глобулинов [20]. В качестве одного из молекулярных механизмов аттенуации может быть использован метод удаления генов из бактерий [13].

Необходимыми качествами живых вакцин являются генетическая однородность популяции и генетическая стабильность биологических характеристик штамма. Они должны оставаться стабильными при многократном пассировании в субстрате получения препарата [2].

Стабильность рекомбинантных плазмид в популяции зависит от генетического контроля репликации и сегрегации, мобилизации, несовместимости, скорости роста клеток, условий культивирования, воздействия экспрессии клонированного гена [1]. Все указанные выше факторы, кроме последнего, достаточно полно описаны в отношении собственных плазмид чумного микроба, которые весьма стабильно сохраняются в микробной клетке в широком диапазоне условий культивирования [10].

Цель настоящего исследования - получение рекомбинантных конструкций на основе плазмид pPst и pCad и оценка стабильности их наследования в клетках чумного микроба.

Используемые штаммы чумного микроба представлены в таблице 1. Характеристика штамма кишечной палочки НВ101 приведена в работе Маниатиса [4].

Векторы, которыми пользовались авторы, представлены в таблице 2.

Определение V-антигена проводили в реакции двойной диффузионной преципитации (РДП) с монорецепторной анти-V-сывороткой по  $\ddot{O}$ uchterlony [14].

$Ca^{2+}$ -зависимость определяли согласно "Руководству по профилактике чумы" [8].

Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом [4]. Клоны, утрачившие плазмиду pCad, отбирали на кальцийдефицитной среде при 37 °С [8]. Рестриктазо-лигазную, космидную технику и молекулярное клонирование осуществляли согласно руководству Маниатиса [4].

Клетки кишечной палочки трансформировали плазмидной ДНК по методу Cohen с соавт. [4].

Криотрансформацию бактерий чумы проводили в модификации Кокушкина [3].

Трансдукцию *E. coli* и *Y. pestis* осуществляли согласно руководству Миллера [5].

Время генерации микробных клеток определяли по Шлегелю [11].

Таблица 1

Штаммы чумного микроба, использованные в работе

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Характеристика	Источник получения
EV НИИЭГ	pFra <sup>+</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>+</sup> , Pgm <sup>-</sup>	Музей живых культур (МЖК) ВНИИПМ
EV11M	pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> , Pgm <sup>-</sup>	"
EV11MpBR322	трансформант EV11M pBR322	Получен авторами
EV11MpV9	трансформант EV11M pV9	"
EV11MpPW14	трансформант EV11M pPW14	"
EV11MpVH65	трансформант EV11M pVH65	"
EV11MpVH68	трансформант EV11M pVH68	"
1146	pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>+</sup> , pPst <sup>-</sup> , Pgm <sup>+</sup>	МЖК ВНИИПМ
1146/I	pFra <sup>-</sup> , pCad <sup>-</sup> , pPst <sup>-</sup> , Pgm <sup>+</sup>	Получен авторами
1146/IpCDc	трансдуктант 1146/I pCDc	"

Таблица 2

Использованные в работе векторы

Вектор	Маркеры	Ссылка на литературу
pBR322	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	[4]
pBR325	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	[19]
pHC79	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	[9]
P1 <i>clm clr</i> 100ts	Ap <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	[5]

V-оперон клонировали в составе 7-го *Hind*III-фрагмента плазмиды pCad из вакцинного штамма EV на плазмидном векторе pBR322. Следует отметить, что полученная нами плаزمида pV9 (рис. 1) имела на один сайт узнавания меньше для рестриктазы *Clal*, чем аналогичная плазмида, полученная Perry с соавт. [15].

Передача плазмиды pV9 в штамм EV11M чумного микроба, лишенный V-признака, приводила к восстановлению синтеза V-антигена. Однако на неселективных средах трансформанты довольно быстро утрачивали Ap<sup>R</sup> маркер и V<sup>+</sup> фенотип, что было связано с элиминацией гибридной плазмиды (табл. 3). В то же время известно, что собственные

плазмиды *Y. pestis* весьма стабильно сохраняются в микробной клетке [10]. Плазмида pPst была предложена а качестве основы для конструирования плазмидных векторов [6]. Для повышения стабильности наследования клонированных генов в клетках чумного микроба использовали плазмидный вектор pPW14, содержащий *HindIII*-*PstI* фрагмент плазмиды pPst *Y. pestis*, включающий *pst* и *pla* гены, а также область начала репликации *ori* и *PstI*-*HindIII* участок плазмиды pBR325, содержащий ген хлорамфениколацетилтрансферазы (рис. 1).

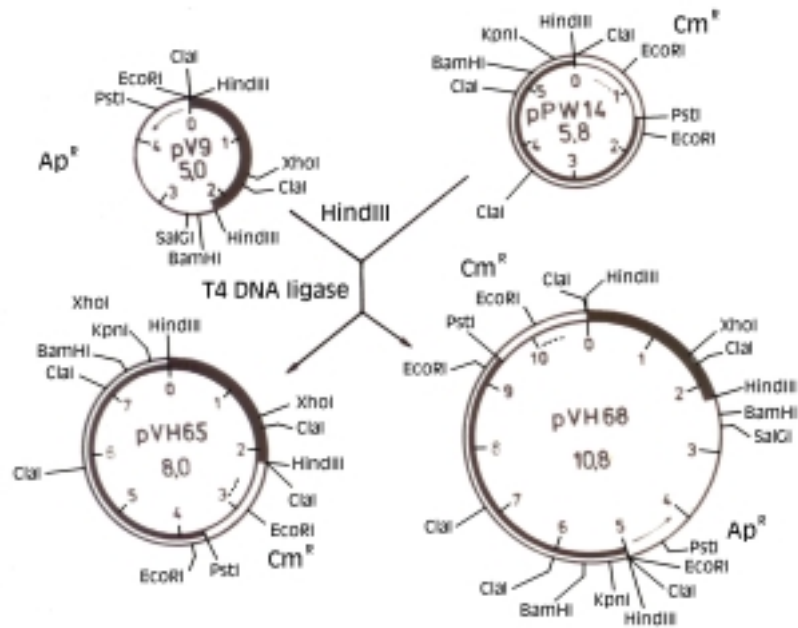


Рис. 1. Схема получения и строение гибридных плазмид с V-опероном

Встраивание *HindIII*-фрагментов плазмиды pV9 проводили в *HindIII* сайт вектора pPW14, в результате чего были получены две плазмиды pVH65 и pVH68, кодирующие синтез V-антигена, пестицина I, фибринолизина-плазмокоагулазы и несущие соответственно маркеры Cm<sup>R</sup> и Ap<sup>R</sup>. Физические карты этих плазмид показаны на рис. 1, из которого видно, что плазмиды pVH65 и pVH68 содержат *HindIII*-фрагмент размером 2,2 Md с V-геном в противоположных ориентациях, а плазмида pVH68, кроме того, содержит ДНК плазмиды pBR322.

ДНК плазмид pPW14, pBR322, pVH65, pVH66 и pV9 были введены в бесплазмидный штамм *Y. pestis* EV11M методом криотрансформации. Трансформанты исследовали на стабильность наследования селективных маркеров при выращивании культур в бульоне LB при 28 °С.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что плазмидный вектор pBR322 не способен стабильно наследоваться и обеспечивать стабилизацию клонированных в его составе фрагментов ДНК (pV9) в клетках *Y. pestis*. В то же время на протяжении 40 поколений в культуре чумного микроба не отмечались сегреганты, утратившие рекомбинантные конструкции на основе плазмиды пестициногенности (pPW14, pVH65). Бирепликонная плазмида pVH68 занимала по частоте элиминации промежуточное положение.

Таблица 3  
Стабильность наследования плазмид в штамме *Y. pestis* EV11M при выращивании его на неселективной среде

Плазмиды	Число поколений	Частота потери селективного маркера, %
pBR322	20	95
	40	100
pV9	40	100
pPW14	40	0
pVH65	40	0
pVH68	40	46

Следующим этапом работы было получение рекомбинантных конструкций с клонированными фрагментами плазмиды pCad, сохранивших область начала репликации, способность определять Ca<sup>2+</sup>-зависимость и утративших способность к синтезу V-антигена.

В качестве исходного материала для клонирования генов Ca<sup>2+</sup>-зависимости был использован банк генетических элементов высокомолекулярных плазмид *Y. pestis*, полученный с помощью рестриктазы *EcoRI* основе космиды pHC79. Ее фаголизатом трансдуцировали клетки *E. coli* HB101, в результате чего было получено 120 независимых клонов

трансдуктантов. При пересеве их на магниево-оксалатный агар не удалось выявить ни одного  $Ca^{2+}$ -зависимого клона. Аналогичные результаты были получены Portnoy с соавт. [17] при передаче в клетки *E. coli* LE392 полного репликона плазмиды pCad с помощью фага P1.

Для изучения экспрессии клонированных генов высокомолекулярных плазмид применяли также клетки чумного микроба штамма 1146/I. Донором банка генетических элементов служили 120 ранее полученных нами клонов трансдуктантов *E. coli* HB101. В результате передачи банка генов было получено 300 трансдуктантов штамма *Y. pestis* 1146/I, три из которых оказались  $Ca^{2+}$ -зависимыми.

Анализ с помощью рестриктазы *Bam*HI выделенной из этих клонов плазмидной ДНК позволил установить идентичность трех полученных гибридных плазмид и локализовать клонированную область на физической карте плазмиды pCad чумного микроба.

На рисунке 2 показано, что клонированная область плазмиды pCad не включает V-ген. В РДП с V-сывороткой клеточный лизат штамма *Y. pestis* 1146/IpCDc не давал линии преципитации. Из рисунка следует, что плаزمида pCDc содержит шестой *Bam*HI-фрагмент плазмиды pCad, включающий область, ответственную за репликацию плазмиды pCDc в клетках *Y. pestis* без селективного давления. Действительно, после 50 генераций штамма чумного микроба 1146/IpCDc, выращиваемого при 28 °C в бульоне LB без антибиотиков, был произведен высев культуры на магниево-оксалатный агар по  $10^6$  м.к. на чашку. Как и следовало ожидать, через двое суток на чашках, инкубируемых при 28 °C, отмечали сплошной рост, а при 37 °C не выросло ни одной колонии (в магниево-оксалатный агар антибиотики не добавляли).

Следует отметить, что клонированный нами 42 т.п.н. фрагмент плазмиды pCad, отвечающий за признак  $Ca^{2+}$ -зависимости, лишь на 3-4 т.п. перекрывает 17 т.п.н. область, которая, по мнению зарубежных ученых [12, 16, 18], ответственна за данное свойство и нарушение структуры которой ведет к исчезновению  $Ca^{2+}$ -зависимости.

Результаты наших опытов по клонированию *cad*-генов согласуются с данными Можарова и соавт. [7], которые также пошли по пути клонирования локуса кальцийзависимости. По их данным, меньший *Sal*G1-фрагмент плазмиды pCad в составе векторной плазмиды pUC4K обеспечивал трансформированным клеткам чумного и псевдотуберкулезного микробов экспрессию признака  $Ca^{2+}$ -зависимости.

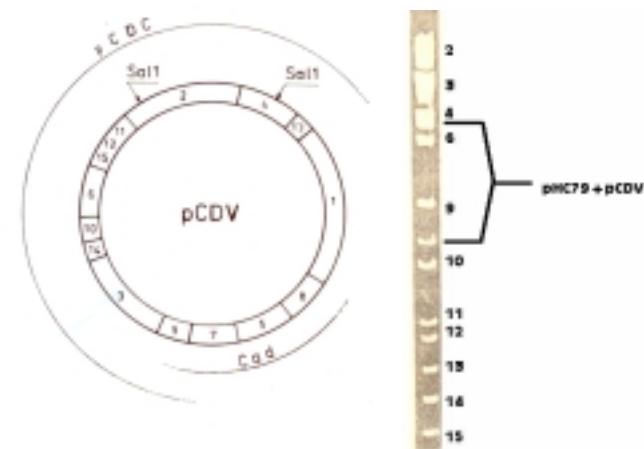


Рис.2. Клонированный фрагмент ДНК плазмиды pCad (pCDV). pCDc - клонированный фрагмент; Cad - область плазмиды, отвечающая, по мнению D.A. Portnoy, S. Falkow, за признак  $Ca^{2+}$ -зависимости [16, 18]. На кольцевой карте плазмиды pCad указаны сайты рестрикции для эндонуклеазы *Bam*HI [16]. Справа дана электрофореграмма продуктов гидролиза плазмиды pCDc рестриктазой *Bam*HI.

Таким образом, установлено, что плазмиды pPst и pCad могут быть использованы в качестве векторных систем для стабилизации генетической информации в клетках чумного микроба.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А., Лапина Г.Ф. // Биотехнология. - 1988.- Т. 4, № 4. - С. 433-441. - 2. Доклинические испытания новых медицинских иммунобиологических препаратов. Основные положения // ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Утверждены и введены в действие Минздравом СССР 10.04.89. - М., 1989. - 3. Кокушин А.М. // Мол. биол. и генет. возбудит. особо опасных инф. - Саратов, 1982. - Ч. 1. - С. 28-33.- 4. Маниатис Т., Фрич Э.Ф., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы

генетической инженерии. - М.: Мир, 1984. - 5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. - М.: Мир, 1976. - 6. Можаров О.Т. // Молекулярно-биологическая характеристика плазмиды пестициногенности чумного микроба: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1983. - 7. Можаров О.Т. и др. // Мол. биол. и микробиол. природно-очаговых инф. - Саратов, 1986. - С. 63-70. - 8. Руководство по профилактике чумы / Под ред. Н.И. Николаева. Саратов, 1972. - 9. Рыбчин В.И. Основы генетической инженерии: Учебное пособие для вузов. - Минск: Высшая школа, 1986. - 10. Шведун Г.П. // Изучение некоторых физических свойств и биологической активности плазмиды  $Ca^{2+}$ -зависимости, у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. - Саратов, 1983. - 11. Шлегель Г. // Общая микробиология. - М.: Мир, 1987. - 12. Goguen J.D. // J. Bacteriol. - 1984. - V. 160, N 3. - P. 842-846. - 13. Jasin M., Schimmel P.R. // Пат. 4713337, США, Заявл. 03.01.85. N 688612, опубл. 15.12.87, МКИ С 12 15/00, НКИ 435/1723. - 14. Öuchterlony O. // Acta Pathol. Microbiol. Scand. - 1949. - V. 26, N 4. - P. 507-515. - 15. Perry R.D. et al. // Infect. Immun. - 1986. - V. 54, N 2. - P. 428-434. - 16. Portnoy D.A., Falkow S. // J. Bacteriol. - 1981. - V. 148, N 3. - P. 877-883. - 17. Portnoy D.A., Blank H.F. et al. // J. Infect. Dis. - 1983. - V. 148, N 2. - P. 297-304. - 18. Portnoy D.A., Wolf-Watz H. et al. // Infect. Immun. - 1984. - V. 43, N 1. - P. 108-114. - 19. Prentki P. et al. // Gene. - 1981. - V. 14, N 4. - P. 289-299. - 20. Sanchez J., Swennerholm A.M., Holmgren J. // FEBS Lett. - 1988. - V. 24, N 1-2. - P. 110-114.