

# ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

№ 3 (73)

САРАТОВ 1993

УДК 616.981.452:575

И. Г. ДРОЗДОВ, И. Н. ЕЖОВ, С. В. САМОЙЛОВА, А. П. АНИСИМОВ,  
А. В. КАРЛЫШЕВ, В. И. КРАВЧЕНКО, В. М. КРАСИЛЬНИКОВА,  
С. А. ЕРЕМИН, А. К. НИКИФОРОВ

## СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕСКАПСУЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

Саратов, Оболенск

Сконструирован гибридный репликой rFS23, содержащий функционально неактивный участок *fra*-оперона rFra *Yersinia pestis* EV и способный к гомологичной рекомбинации с плазмидой rFra при введении в клетки чумного микроба. Использование rFS23 позволило получить коллекцию вирулентных штаммов чумного микроба, утративших способность синтезировать видоспецифический капсульный антиген - ФI.

Направленное конструирование бескапсульных штаммов чумного микроба в лабораторных условиях до настоящего времени представляет определенные трудности.

Известно несколько способов селекции подобных вариантов [4, 9, 11]. Но утрата способности синтезировать ФI у возбудителя чумы часто сопровождается конверсией к авирулентности для лабораторных животных [2, 8]. К недостаткам этих методов также следует отнести трудоемкость и, как правило, нестабильность получаемых культур. Последнее обусловлено возможностью временного снижения или прекращения синтеза бактериальными клетками капсульного антигена при сохранении целостности генетической структуры, потенциально способной к экспрессии денного признака. Получение стабильных мутантов возбудителя чумы с фенотипом Fra<sup>-</sup> требует необратимого выключения соответствующего генетического локуса за счет образования направленных делений. Однако используемое для этих целей выращивание культур на кальций-дефицитных средах при

37 °С [4] вызывает не только повреждения rFga, но инсерции и делеции плазмиды rCad, а также мутации в хромосоме *Y. pestis*. Отсутствие направленного мутагенного эффекта при воздействии на клетки чумного микроба бромистым этидием присуще и методу Tsukano с соавт. [11]. Все это неизбежно приводит к неконтролируемому изменению биологических свойств получаемых мутантов.

Целью настоящего исследования явилось получение способом направленного делеционного мутагенеза бескапсульных производных возбудителя чумы.

В работе были использованы 5 штаммов чумного микроба, характеристика которых представлена в таблице. В качестве донора репликона rFS23 использовали штамм *Escherichia coli* HB101 rF323, сконструированный авторами.

Для приготовления лизатов донорных штаммов использовали модификацию способа выделения плазмид для скрининг-электрофореза [7]. Трансформацию бактерий возбудителя чумы осуществляли по разработанному нами методу [3] с помощью генератора электрических импульсов фирмы Bio-Rad (США). Скрининг плазмид проводили по методу Kado и Liu [10].

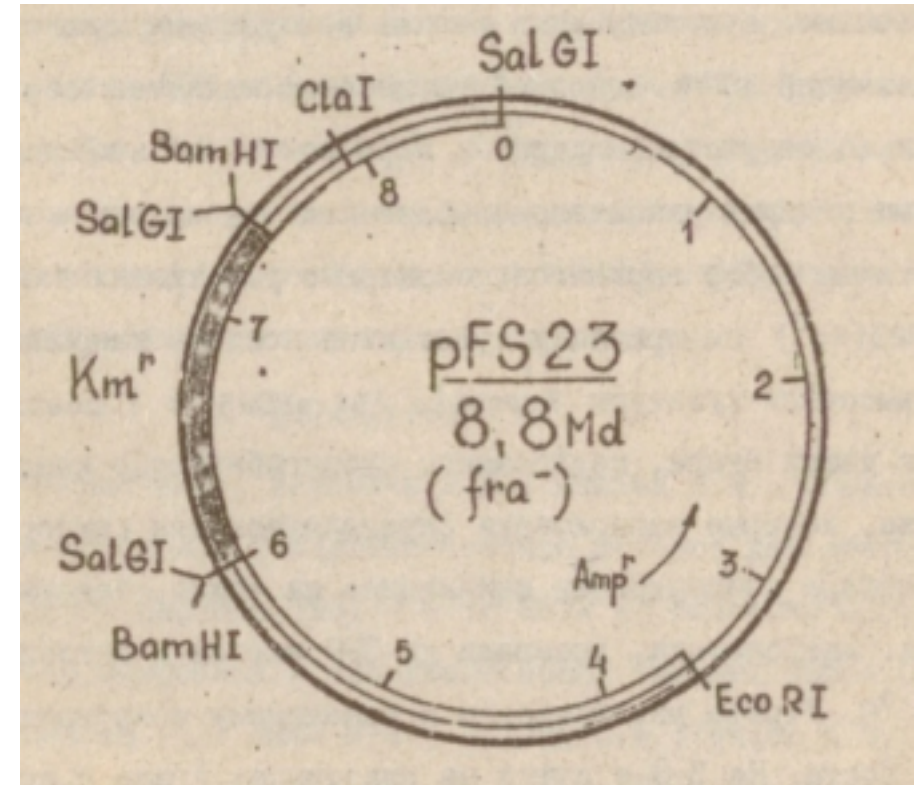
Направленный делеционный мутагенез проводили путем передачи в клетки чумного микроба специально созданного нами для этих целей гибридного репликона rFS23. Он был получен на основе конструкции, включающей в качестве векторной части *SalG1-EcoR1*-фрагмент космидного вектора рHC79 [6], содержащий ген  $\beta$ -лактамазы ( $Ap^R$ ) и область репликации из плазмиды рB222 [5], не обеспечивающую стабильное наследование созданных; на его основе репликонов в клетках возбудителя чумы без селективного давления [1]. Клонированный участок представляет собой *SalG1-EcoR1*-фрагмент плазмиды rFga из вакцинного штамма *Y. pestis* EV, имеющий делецию *Cla1* фрагмента. Эта делеция затрагивает структур-

Характеристика штаммов чумного микроба, использованных в работе

Штаммы	Характеристика	Источник получения
231(709)	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Cad <sup>+</sup> V <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Fb <sup>+</sup> Cg <sup>+</sup> Psb <sup>+</sup>	МЖК РосНИПЧИ "Микроб"
231Psb <sup>-</sup>	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Cad <sup>+</sup> V <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Fb <sup>+</sup> Cg <sup>+</sup> Psb <sup>-</sup>	Получен от Кутырева В.В.
231pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Cad <sup>+</sup> V <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Fb <sup>-</sup> Cg <sup>-</sup> Psb <sup>+</sup>	Сконструирован Самойловой С.В., Ежовым И.Н. и др.
358	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Cad <sup>+</sup> V <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Fb <sup>+</sup> Cg <sup>+</sup> Psb <sup>+</sup>	МЖК РосНИПЧИ "Микроб"
358pPst <sup>-</sup>	Fra <sup>+</sup> Tox <sup>+</sup> Cad <sup>+</sup> V <sup>+</sup> Pst <sup>+</sup> Fb <sup>-</sup> Cg <sup>-</sup> Psb <sup>+</sup>	Сконструирован Самойловой С.В., Ежовым И.Н. и др.

ную часть *fra*-оперона. В *Bam*HI сайт клонированного фрагмента встроен ген канамицинфосфотрансферазы ( $Km^R$ ) из плазмиды pUC4K [12]. Полученная вышеуказанным способом плазида pFS23 имеет молекулярную массу 8,8 Md, ее рестрикционная карта приведена на рисунке.

Особенностью указанного репликона является наличие областей гомологии с плазмидой чумного микроба pFra, фланкирующих ген канамицинустойчивости, что при введении в клетки *Y. pestis* гибридного репликона pFS23 обеспечивает гомологичную рекомбинацию с плазмидой pFra. В результате этого у части клеток микробной популяции на интактном репликоне pFra происходит замещение структурной части *fra*-оперона на фрагмент рекомбинантной конструкции с геном  $Km^R$ , а векторная часть pFS23 с геном  $Amp^R$  спонтанно элиминирует из микробных клеток. Такие клетки, несущие функционально дефектный репликон pFra, дают потомство с фенотипом  $Fra^- Tox^+ Amp^S Km^R$ . Первичный отбор трансформантов мы проводили на агаре Хоттингера (pH 7,2), содержащем 25 мкг/мл канамицина, в течение 2-3 сут при 28 °C. Выросшие клоны или сразу тестировали на среде, содержащей 100 мкг/мл ампицилина (в этом случае удавалось получить от 0,1 до 15 % клонов с фенотипом  $Amp^S Km^R$ ), или предварительно пассировали в организме белых мышей, иммунизированных препаратом ФI, что значительно увеличивало содержание в популяции рекомбинантных клонов с указанным фенотипом.



Рестрикционная карта плазмиды pFS23

192

Полученные культуры с фенотипом  $\text{Amp}^S \text{Km}^R$  в 100 % случаев несли делецию структурной части *fra*-оперона плазмиды *pFra*, что было подтверждено отрицательными результатами РПГА с антикапсульным эритроцитарным диагностикумом во всех разведениях. Они объединялись поштаммно в отдельные штоки, которые двукратно "анимализировались" сначала в организме белых мышей, а затем - морских свинок. Субкультуры, прошедшие два прямых пассажа, использовались в дальнейшем исследовании.

Как известно, при получении клонов возбудителя чумы с утраченной плазмидой *pFra* основной трудностью является их селекция, обусловленная отсутствием удобных маркеров. Использование полученных нами штаммов значительно облегчило эту задачу и позволило осуществить отбор вариантов, спонтанно утративших плазмиду *pFra::pFS23(Km<sup>R</sup>)* по признаку чувствительности к канамицину. Для этого мы высевали культуры *Y. pestis* 231*pFS23* и *Y. pestis* 353*pFS23* на чашки агара, содержащего субингибирующие концентрации антибиотика, которые эмпирически определялись для каждого штамма. С целью подбора концентрации канамицина на чашки, содержание от 1 до 10 ед. антибиотика, высевали до 300 клеток и инкубировали их при 26 °С. Утрата устойчивости к канамицину сопровождалась задержкой роста. На 3-5-е сутки на пластинках агара с концентрацией антибиотика 1-2 мкг/мл мы наблюдали колонии, значительно различающиеся по размерам. Наиболее мелкие колонии отбирали и повторно тестировали на чувствительность к канамицину (50 мкг/мл). В случае отсутствия роста субкультуры отсеивали на агаровую среду, не содержащую антибиотик, затем изучали в РПГА и подвергали скрининг-электрофорезу. Все полученные  $\text{Km}^R$ -варианты закономерно характеризовались фенотипом  $\text{Fra}^-$  и генотипом  $\text{pFra}^-$  что свидетельствует о высокой стабильности наследования рекомбинирующего участка *pFS23* в составе плазмиды *pFra* и позволяет судить о частоте элиминации репликона *pFra::pFS23* из клеток чумного микроба

в

есте-

ственных условиях. Эта величина в условиях наших экспериментов составляла примерно  $2,5 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-5}$  от общего количества клеток, взятых в исследование, что указывает на возможность довольно частого появления таких клонов в природных условиях.

Таким образом, применение метода направленного делеционного мутагенеза с использованием гибридного репликона *pFS23* позволило нам сконструировать на основе вирулентных штаммов *Y. pestis* 231 и *Y. pestis* 358 коллекцию штаммов чумного микроба стабильно проявляющих фенотип  $\text{Fra}^- \text{Tox}^+$  и вариантов, лишенных *pFra*.

Получение указанных штаммов значительно расширяет возможности использования направленной редукции генома возбудителя чумы в генетических и иммунологических исследованиях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимов А.П., Карлышев А.В., Павлов В.М., Кравченко В.И. // Генет., микробиол. и совершенствование методов лаб. диагн. особо опасных инф. - Саратов, 1991. - С.18-25. - 2. Акимович В.В., Шанина Л.Н. // Вопр. микробиол. и лаб. диагн. особо опасных инф. - Саратов, 1965. - С. 54-58. - 3. Ежов И.Н., Еремин С.А., Тучков И.В. и др. // Лаб. диагностика и генет. вирулентности возбудит. особо опасных инф. - Саратов, 1990. - С. 92-95. - 4. Заренков М.И., Гончарова Н.А. Способ получения бескапсульных штаммов чумного микроба // А.С. 1439122 СССР МКЦ с 12 N 15/00 - N 4123258/28-13; Заявл. 26.09.86; Опубл. 23.11.88. Бюл. № 17. - 5. Маниатис Т., Фрич Э.Ф., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование / Методы генетической инженерии. - М.: Мир, 1984. - 6. Рыбчин В.Н. // Основы генетической инженерии. - Минск, Высшая школа, 1986. - С. 86. - Birnboim H.C., Doly I. // Nucl. Acids Res. - 1979. - V. 7. - P. 1513. - 8. Brubaker R.R. // Curr.

Topics Microbiol. Immunol. - 1972. - V. 57. - P. 112-158. - **9**. Burrows T.W. // Brit. Med. Bull. - 1962. - V. 18, N 1. - P. 69-73. - **10**. Kado C.I., Liu S.T. // J. Bacteriol. - 1981. - V. 145. - P. 1365-1373. - **11**. Tsukano H., Wake A., Sakakibara Y. // Microbiol, Immunol. - 1986. - V. 30, N 9. - P. 837-848. - **12**. Vieira J., Mezzing J. // Gene. - 1982. - V. 19, N 3. - P.259-268.