

ТРАНСДУКЦИЯ, КАК ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ПРИОБРЕТЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У ЭРВИНИЙ

Трансдукция – один из ключевых процессов горизонтального переноса генов у бактерий. Известно, что она задействована в распространении главных факторов патогенности среди многих энтеробактерий.

Впервые показано, что *cleaг*-мутанты и некоторые варианты умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* способны осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов бактерии *E. carotovora*. Показатели хромосомных частот трансдукции маркеров – *arg*⁺, *met*⁺, *trp*⁺, *iga*⁺ имеют широкий диапазон значений: $7,0 \cdot 10^{-8}$ - $1,1 \cdot 10^{-4}$. За счет инфицирования реципиентных бактерий на твердой среде LB удалось повысить эффективность трансдукции. Такой подход важен для фагов, подобных ZF40, у которых адсорбция сопровождается реадсорбцией фаговых частиц. Механизм переноса бактериальных генов по типу общей трансдукции сопряжен с циклической пермутацией фаговой ДНК.

Представленные результаты создают предпосылки для использования вариантов бактериофага ZF40 в качестве удобного инструмента для генетического изучения *E. carotovora*.

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, умеренный бактериофаг ZF40, общая трансдукция, пермутация.

Приобретение генетического материала является существенным событием в адаптации микробов к окружающей среде. В природе это происходит благодаря трем важным процессам – конъюгации, трансформации, трансдукции, за счет механизмов общей и сайт-специфической рекомбинации. Трансдукция – процесс, при котором новая генетическая информация вносится в бактериальную клетку трансдуцирующими бактериофагами. [10,16]. В настоящее время установлено, что практически каждый известный вид бактерий является хозяином для одного или нескольких вирулентных и умеренных бактериофагов. Фагам отведена роль универсального инструмента при горизонтальном переносе генов, в способности преодолевать межвидовые генетические барьеры, широко распространяя вирулентные гены, в том числе и гены, отвечающие за формирование патогенности у бактерий. [1,14].

Главным этапом в образовании трансдуцирующих частиц бактериофагов является процесс упаковки ДНК. В основе механизма общей трансдукции лежит циклическая пермутация фагового генома, которая позволяет упаковывать в прокапсид не только фаговую, но и любой участок бактериальной хромосомы. [12]. Ранее было установлено, что для фага ZF40 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) характерна циклическая пермутация вирионной ДНК, а механизм упаковки генома идет по типу "заполнения" головки [7]

Цель представленной работы состояла в изучении нового универсального трансдуцирующего вектора – бактериофага ZF40 и его вариантов, которые способны осуществлять перенос хромосомных генов и внехромосомных генетических элементов.

Материалы и методы. Объектами настоящего исследования были трансдуцирующие фаги: два *cleaг*-мутанта фага ZF40 – *c₆* и 421 [3,4], а также его вариант – RT80, который репродуцировался на неспецифическом хозяине *E. carotovora* subsp. *carotovora* J2 [9]. ZF40*c₆* – точечный мутант, был получен с помощью гидроксилamina [4]. Вирулентный мутант ZF40/421 имеет более существенные и значимые изменения в упаковке ДНК [3]. Трансдуцирующие лизаты вариантов фага ZF40 получали методом слитного лизиса на штаммах-донорах *EccRC5297* и *EccJ2* Реципиентами для последующего заражения служили аукоотрофные мутанты *E. carotovora*. Биохимические мутанты, зависимые по урацилу *Ecc62A-d1/7*, *Ecc62A-d1/8* получены после действия 2-аминопуриннитрата [5]. Группа других мутантов, *Ecc62A-d1/50arg*, *Ecc62A-d1/P5met*, *Ecc62A-d1/17-8met*, *Ecc62A-d1/58met*, *EccJ2-15trp*, *EccJ2-101-trp*, *EccJ2-109trp* была получена с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина - НГ [5]. Конечная концентрация НГ в мутагенизируемой смеси составляла 250–500 мкг/мл. Для

определения переноса генов нехромосомного происхождения использовали плазмиду R6K *Escherichia coli* с генами устойчивости к ампициллину и стрептомицину [11]. С помощью трансконъюгации эта плазида была перенесена в клетки бактерии *EccJ2*, которая служила индикаторным штаммом для фага ZF40-RT80. Эксперименты по трансдукции проводили непосредственно на чашках Петри с твердой средой LB. Это обусловлено тем, что процесс прикрепления фага к чувствительным клеткам является двустадийным. После 10-20 минутного периода адсорбции наблюдается реадсорбция частиц, при которой до 50 % фага отсоединяется от клеток и переходит в свободное состояние [4]. Трансдуцирующие лизаты с титром $2,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, а также их разведения 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} наносили непосредственно на чашечные газоны индикаторных штаммов и инкубировали 18 часов при 28 °С. Затем в местах нанесения пятен фаголизатов вырезали агаровые блочки размером $3 \times 3 \times 3$ мм с выжившими клетками индикаторного штамма и помещали их в 2 мл жидкой среды LB. Блочки инкубировали 18 часов при 28 °С. Суспензию клеток центрифугировали при 10000 об/мин на микроцентрифуге ELM1, 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл жидкой минимальной среды А1 и весь объем наносили на контрольные чашки с твердой минимальной средой не содержащей ростовой фактор. Отбор и учет количества трансдуктантов проводили через 72 часа. Частоту трансдукции выражали отношением числа трансдуктантов к числу бляшкообразующих частиц в 1 мл (БОЕ/мл) [6].

Выделение ДНК плазмид и их электрофоретическое разделение осуществляли согласно работам [1,13].

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных экспериментов нам удалось осуществить перенос хромосомных маркеров arg^+ , met^+ , ura^+ , trp^+ различными вариантами фага ZF40 (таблица). Частоты трансдукции биохимических маркеров ауксотрофных мутантов характеризуются широким диапазоном значений: $7,0 \times 10^{-8}$ - $2,0 \times 10^{-4}$. Низкая частота переноса для маркера ura^+-1 очевидно, связана с особенностью мутации в этом локусе. Это подтверждается достаточно высоким значением частоты трансдукции для другого локуса ura^+-2 , который, возможно, расположен в другом опероне. То, что эти локусы отличаются, демонстрируют показатели частоты обратных мутаций – $< 2,2 \times 10^{-9}$ и $7,5 \times 10^{-8}$ для ura^+-1 и ura^+-2 соответственно (таблица). Существенные изменения в геноме ZF40/421, связанные с нарушением упаковки ДНК в прокапсид, делают возможным трансдукцию хромосомных маркеров и характеризуются более высокими показателями частоты: от $1,4 \times 10^{-6}$ до $7,5 \times 10^{-5}$ для представителей двух популяционных наборов фага ZF40/421 [3].

Таблица

Частота трансдукции генетических маркеров *E. carotovora* фагом ZF40

Штамм-реципиент Есс	Трансдуцируемый маркер	Мутанты фага ZF40				Частота обратных мутаций
		c_6	421-1*	421-2*	RT80	
62A-d1	ura^+-1	$7,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-6}$	–	–	$< 2,2 \times 10^{-9}$
	ura^+-2	$1,3 \times 10^{-5}$	–	–	–	$7,5 \times 10^{-8}$
	arg^+	–	–	$1,1 \times 10^{-5}$	–	$1,9 \times 10^{-7}$
	met^+-1	$2,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-5}$	–	$1,4 \times 10^{-7}$
	met^+-2	–	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	–	$1,0 \times 10^{-6}$
	met^+-3	–	$6,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	–	$< 2,0 \times 10^{-8}$
J2	trp^+-1	–	–	–	не обнаруж.	$< 2,5 \times 10^{-9}$
	trp^+-2	–	–	–	$1,6 \times 10^{-5}$	$< 2,0 \times 10^{-9}$
	$Ap^+ Sm^r$	–	–	–	$7,5 \times 10^{-6}$	$< 1,2 \times 10^{-9}$

* - представители двух популяционных наборов фага ZF40/421

“ – “ не исследовали

Обнаружено, что при инфицировании фагом ZF40-RT80 клетки неспецифического хозяина *EccJ2* образуют избыток капсидных структур, т.е. наблюдается накопление наночастиц фаговой природы при abortивной инфекции [9]. Применение фага ZF40-RT80 как трансдуцирующего вектора у неспецифического хозяина *EccJ2* показало возможность переноса бактериальных генов. Частота трансдукции trp^+ локуса мутанта *EccJ2-101trp* составила $1,6 \times 10^{-5}$, тогда как у другого мутанта *EccJ2-15trp* передачи trp^+ маркера не было обнаружено (таблица).

Известно, что генетическая карта *E. coli* является когерентной с таковыми других энтеробактерий, в том числе и эрвиний [2]. У *E. carotovora*, скорее всего, trp-кластер, пространственно сегрегирован на несколько генов (*E. coli* имеет 9 таких генов). Поэтому, вероятность упаковки отдельных trp-генов в фаговый капсид будет существенно различаться.

Для многих фагов с перемутированными ДНК показана способность осуществлять генерализованную трансдукцию не только бактериальных, но и плазмидных генетических маркеров. Ранее была продемонстрирована возможность переноса плазмиды pKM101 мутантами бактериофага ZF40 [8]. При изучении переноса экстрахромосомальных генов вектором ZF40-RT80 в неспецифическом хозяине использовали плазмиду R6K, которая несет маркеры устойчивости к ампициллину и стрептомицину [11]. Известно, что трансмиссивная плаزمида R6K принадлежит к X – группе несовместимости (IncX). Она является многокопийной. Количество мономерных форм увеличивается от 13 в логарифмической до 38 в стационарной фазе роста, а число димеров – около одного на хромосому – является постоянным на всех стадиях роста бактерии. Молекулярная масса R6K составляет 39 т.п.н., что не превышает упаковочный размер головки фага ZF40.

Результаты экспериментов по переносу генов нехромосомного происхождения показали, что частота приобретения плазмидных маркеров составляет $7,5 \times 10^{-6}$ (таблица). Исследования электрофоретических профилей продемонстрировали, что плазмида R6K привносится и передается бактериальным клеткам как интактная единица (рисунок).

Как было отмечено выше, специфические мутации в геноме фага, а также низкая множественность инфекции (0,01-0,1) позволили получить жизнеспособные трансдуктанты. При первичном отборе наблюдали выраженную гетерогенность колоний трансдуктантов. Однако все варианты хорошо росли на селективных средах и были резистентны к трансдуцирующим фагам.

Способность различных вариантов фага ZF40 переносить гены: *arg*, *met*, *ura* trp бактерии-хозяина, а также внехромосомные маркеры плазмиды R6K позволило нам отнести эти фаги к общетрансдуцирующим. Подобная ситуация характерна для фагов EC2 *E. chrysanthemi* [15], 59 и 49 *E. horticola* [6], фКР *E. carotovora* [16], где перенос *arg*, *met*, *ura* генов наблюдался с частотой $2,0 \times 10^{-8}$ – $9,0 \times 10^{-6}$. Использование твердой среды LB позволило увеличить частоту трансдукции от $7,0 \times 10^{-8}$ до $2,0 \times 10^{-4}$. Применение такого подхода важно для фагов, подобных ZF40, которые характеризуются процессом реадсорбции фаговых частиц.

Таким образом, впервые показана способность эрвиниофага ZF40 осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов в системе фитопатогенных штаммов *E. carotovora* различного происхождения. Это создает предпосылки для использования этого фага в качестве инструмента при исследовании молекулярно-генетической организации, генетического анализа и конструирования специфических штаммов практически значимой бактерии *E. carotovora*.

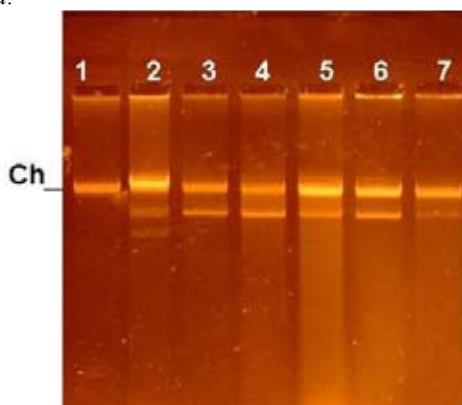


Рисунок. Плазмидные спектры трансдуктантов Есс J2, несущих аутентичную плазмиду R6K: 1 – контрольный образец исходного штамма Есс J2;

2 – конъюгант Есс J2(R6K); 3–7 – варианты Есс J2 полученные после трансдукции фагом ZF40-RT80; Ch – хромосомная ДНК

Л.В. Романюк, М.С. Муквич, Ф.І. Товкач

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

ТРАНСДУКЦІЯ, ЯК ОДИН ІЗ СПОСОБІВ ПРИДБАННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ У ЕРВІНІЇ

Резюме

Трансдукція – один із ключових процесів горизонтального переносу генів у бактерій. Відомо, що вона задіяна в розповсюдженні головних факторів патогенності серед багатьох ентеробактерій.

Вперше показано, що clear-мутанти і деякі варіанти помірного бактеріофага ZF40 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* здатні здійснювати загальну трансдукцію хромосомних и плазмідних генів бактерії *E. carotovora*. Показники хромосомних частот трансдукції маркерів - arg^+ , met^+ , trp^+ , ura^+ мають широкий діапазон значень: $7,0 \cdot 10^{-8}$ - $1,1 \cdot 10^{-4}$. За рахунку інфікування реципієнтних бактерій на твердому середовищі LB вдалося підвищити ефективність трансдукції. Такий підхід важливий для фагів, подібних ZF40, у яких адсорбція супроводжується реадсорбцією фагових часток. Механізм переносу бактеріальних генів по типу загальної трансдукції нерозривно пов'язаний з пермутацією фагової ДНК.

Подані результати створюють передумови для використання варіантів бактеріофага ZF40 у ролі зручного інструменту для генетичного вивчення *E. carotovora*.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, помірний бактеріофаг ZF40, загальна трансдукція, пермутація.

L.V. Romanyuk, N.S. Mukvich, F.I. Tovkach

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

TRANSDUCTION AS ONE OF THE METHODS OF OBTAINING GENETIC INFORMATION IN ERWINIA

S u m m a r y

Transduction is one of the key processes of horizontal transfer of genes in bacteria. It is known that it is involved in distribution of the main factors of pathogenicity among numerous enterobacteria.

It is shown that clear mutants and some variants of the temperate bacteriophage ZF40 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* can perform general transduction of chromosome and plasmid genes of the bacterium *E. carotovora*. The indicators of chromosome transduction frequencies of the markers - arg^+ , met^+ , trp^+ , ura^+ have a broad range of values: $7.10 \cdot 10^{-8}$ – $1.1 \cdot 10^{-4}$. The authors have succeeded in increasing the transduction efficiency due to infecting the recipient bacteria on the solid medium LB. Such approach is important for the phages similar to ZF40 in which adsorption is accompanied by re-adsorption of phage particles. The mechanism of transfer of bacterial genes by the type of general transduction is connected with cyclic permutation of phage DNA.

The presented results create preconditions for using the variants of the bacteriophage ZF40 as convenient instrument for genetic investigation of *E. carotovora*.

The paper is presented in Russian.

К e y w o r d s: *Erwinia carotovora*, temperate bacteriophage ZF40, general transduction, permutation.

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

1. Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Метод исследования горизонтального переноса плазмид у *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2002. – 64, №3. – С. 20–26.
2. Захаров И.А., Мацеллох Б.П. Генетические карты микроорганизмов. – Киев: Наук. думка, 1986. – 250 с.
3. Іваниця Т.В. Особливості дефектної лізогенії *Erwinia carotovora*: Автореф дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2008. – 19 с.
4. Кушкіна А.И., Товкач Ф.И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактеріофага ZF40 // Микробиол. журн. – 2005. – 67, № 3. – С. 50–60.
5. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – Москва: Мир, 1976. – 436 с.

6. Муквич Н.С., Романюк Л.В., Кушко Я.Г. Генетический перенос хромосомальных маркеров *Erwinia horticola* 450 умеренными фагами 49 и 59 // Микробиол. журн. – 1987 – **49**, №4. – С.31–35.
7. Панцина Ф.И., Товкач Ф.И. Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2006. – **68**, №6. – С. 42–47.
8. Панцина А.И., Товкач Ф.И. Генерализованная трансдукция плазмиды рKM101 умеренным бактериофагом ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, № 6. – С. 43–47.
9. Романюк Л.В., Товкач Ф.И., Иванюца Т.В., Кушкина А.И., Остапчук А.Н., Горб Т.Е. Абортивная инфекция у *Erwinia carotovora* как источник наночастиц фаговой природы // Микробиол. журн. – 2010. – **72**, № 6. – С. 51–57.
10. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Winn-Stapley D.A. et al. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy // J. Bacteriol. – 2005. – **187**, № 3. – P. 1091–1104.
11. Heffron F., Sublett R., Hedges R.W., Jacob A.E., Falrow S. The origin of the TEM β -lactamase gene found on plasmids // J. Bacteriol. – 1975. – **122**, № 3. – P. 250–258.
12. Jobočka M.B., Rose D.J., Plunkett G. et al. Genome of bacteriophage P1 // J. Bacteriol. – 2004. – **186**, № 21. – P. 7032–7068.
13. Kado O.I., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – **145**, № 3. – P. 1365–1373.
14. Mann B.A., Slauch J.M. // Transduction of low-copy number plasmids by bacteriophage P22 // Genetics. – 1997. – 146. – P.447–456.
15. Resibois A., Colet M., Faelen et al. EC2, new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi* // Virology. – 1984. – **137**, № 1. – P.102–112.
16. Toth I., Perombelon M., Salmond G. Bacteriophage ОКР mediated generalized transduction in *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – **139**, № 4. – P. 2705–2709.

Отримано 16.03.2010