

Н. В. Черватюк, Ф. И. Товкач, Т. Е. Горб

## Особенности трансформации клеток *Erwinia carotovora* плазмидой pECL18

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

*Transformants Erwinia carotovora subsp. carotovora carrying pECL18 plasmid have been obtained with the help of the modified calcium method. The transformation frequency was  $2.8 \times 10^3$  colonies per  $\mu\text{g}$  of plasmid DNA. It has been established that the calcium competence of *E. carotovora* could be obtained by subjecting the cell from the logarithmic phase of growth to 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  per  $5 \times 10^8$  cell/ml. The frequency of the spontaneous loss of pECL18 plasmid is less than 1%. The ability to restrict the phage reproduction and the nuclease synthesis by the transformants has been studied. Foreign and homing RM-systems are autonomous, i. e. inhibit the phage reproduction independently. The obtained data are the prerequisite to construct a biotechnological system on the basis of non-pathogenic *E. carotovora*.*

*Erwinia carotovora* привлекает внимание исследователей не только как возбудитель “мягкой гнили” экономически важных групп растений, но и как перспективный биотехнологический объект. Изучение молекулярной биологии и генетики этой важной фитопатогенной бактерии связано с решением вопросов о наличии фагов, плазмид, транспозонов, а также о их роли в горизонтальном переносе генов. Их решение возможно при разработке оригинальных генетических и молекулярно-биологических методов исследований. При этом создание условий для горизонтального переноса генов (трансформации, трансдукции, трансфекции) является одним из важных этапов в исследовании генетики данного фитопатогена.

Настоящая работа посвящена разработке эффективной трансформирующей системы для *E. carotovora*, а также изучению основных свойств полученных трансформантов.

В исследовании использованы следующие бактериальные штаммы, бактериофаги и плазмиды:

Бактерии:	
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	
RC5297	Устойчивый к бактериоцину Eca153
M2-4/50RI	Спонтанный диссоциант штамма ECA M2-4 [12]
<i>Escherichia coli</i>	
JM109	F', proAB+, hsdR17( $r_K^-$ $m_K^+$ ), $\lambda$ -г
JM109(pECL18)	
Бактериофаги:	
ZF40 c5/5	clear-мутант фага ZF40
ZF40 mod c5/5	clear-мутант фага ZF40, модифицированный на штамме M2-4/50RI
Плазмиды:	
pECL18	$\text{Ap}^r$ HSD-плазида, restriction-modification system Ecl18KI, RNAI, RNAII, <i>mob</i> и <i>rom</i> гены
pUC19	$\text{Ap}^r$

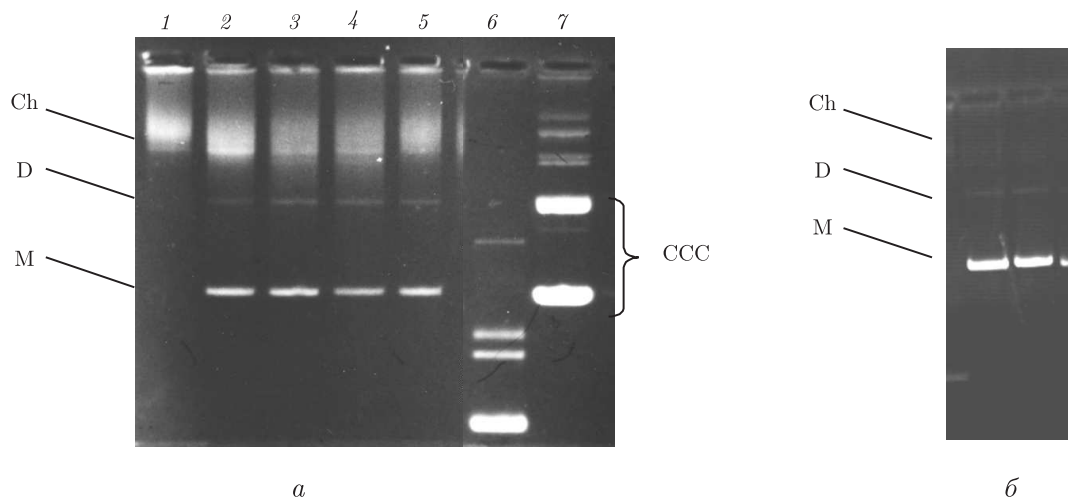


Рис. 1. Плазмидные профили трансформантов *E. carotovora* RC5297(pECL18) (а) и *E. coli* JM109(pECL18) (б): 1 — ECA RC5297; 2–5 — отдельные клоны ECA RC5297(pECL18); 6 — нативная плазмида pUC19; 7 — плазмида pECL18. Ch — бактериальная хромосома; D — димерная плазмидная ДНК; М — мономерная плазмидная ДНК; CCC — сверхспиральная ковалентнозамкнутая ДНК, которая была учтена при расчетах концентрации (см. текст)

Для получения компетентных клеток и их трансформации применяли штамм R-типа *E. carotovora* subsp. *carotovora* 62A — RC5297, устойчивый к бактериоцину EcaEс153 [1, 2]. Выбор штамма для трансформации обусловлен тем, что у R-диссоциантов изменены поверхностные свойства клеток, что, по-видимому, увеличивает их компетентность, т. е. восприимчивость к чужеродной ДНК.

Компетентные клетки трансформировали плазмидой pECL18, которая, кроме гена синтеза  $\beta$ -лактамазы, несет ген, экспрессирующий рестриктазу II типа, Ecl18kI [3]. В этом случае предполагали использовать простой способ селективного отбора клонов и определения их фенотипа: полученные трансформанты, помимо роста на среде с ампициллином (50 мкг/мл), должны ограничивать развитие фагов — фенотип Ap<sup>r</sup> Res<sup>+</sup>.

Получение компетентных клеток и их трансформацию проводили кальциевым методом как указано в [4]. Частоту трансформации рассчитывали на 1 мкг сверхспиральной ковалентнозамкнутой ДНК (рис. 1).

Плазмидные ДНК, полученные по [5], разделяли в 0,8% агарозных гелях.

Для определения концентрации исходной плазмиды электрофореграммы анализировали с помощью программы TotalLab v.2.01; в качестве эталона использовали плазмиду pUC19.

Рестриктазы выделяли согласно [6].

Для получения периплазматических фракций бактериальные клетки выращивали в течение 14 ч в минимальной среде с 0,5% полипектатом натрия и собирали центрифугированием (6000 g, 30 мин). Клеточный осадок отмывали дважды водопроводной водой и инкубировали в течение 2 ч на льду в растворе, содержащем 200 мкг/мл лизоцима, 15% сахарозы, 30 мМ трис-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА. Содержимое супернатанта, полученного после описанной обработки и центрифугирования (17000 g, 30 мин), использовали для проведения гидролиза ДНК фага  $\lambda$  [7].

Трансформация бактерий предполагает получение компетентных клеток, которые способны поглощать ДНК из раствора. Кальцийзависимая компетентность позволяет транс-

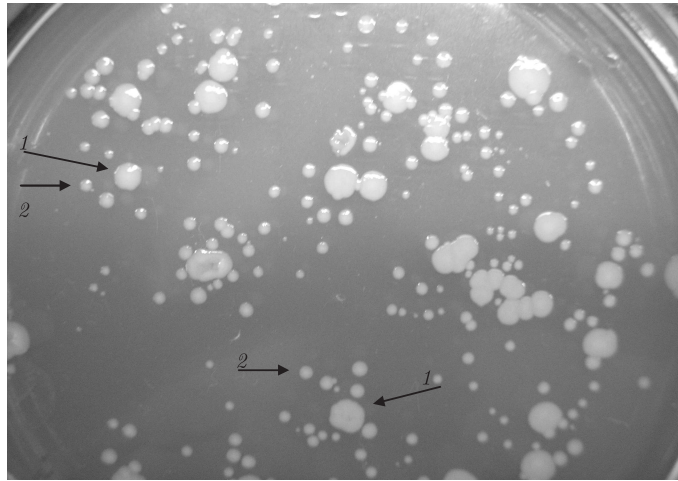


Рис. 2. Чашка Петри с LB-средой с 50 мкг/мл ампициллина после 48 ч культивирования трансформантов *E. carotovora* RC5297(pECL18). Стрелками указаны колонии трансформантов (1) и пережившие за счет наличия экзогенной  $\beta$ -лактамазы колонии исходного штамма *E. carotovora* RC5297 (2)

формировать клетки с частотой до  $10^5$ – $10^8$  клеток на 1 мкг плазмидной ДНК. Однако такая частота характерна лишь для специальных штаммов *Escherichia coli*, например JM109, HB101, TG1, и плазмид pUC18/19, pBR322, pBluescript [4, 8]. Для других же микроорганизмов она значительно ниже. Например, для *E. carotovora* subsp. *carotovora* частота трансформации составляет приблизительно  $1 \cdot 10^2$ – $2,6 \cdot 10^3$  на 1 мкг ДНК плазмиды pBR322 [9].

Одним из важных условий получения компетентных клеток и их успешной трансформации является плотность культуры и поддержание во время всех процедур температуры на уровне 0–4 °С. Большинство описанных протоколов создания компетентности *E. coli* с помощью хлорида кальция предполагают использование клеток в активной логарифмической фазе роста (2 ч при сильной аэрации для *E. coli*) [4]. Однако с применением этого подхода нам не удалось осуществить трансформацию *E. carotovora* RC5297. Одной из причин этого может быть следующее. В независимых исследованиях было показано, что периплазматическая фракция клеток *E. carotovora* после культивирования в течение 12 ч содержит ферменты, деградирующие ДНК. К 24 часам пул этих ферментов в периплазме резко уменьшается. Не исключено, что проведение трансформации в логарифмической фазе роста не будет достаточно эффективным за счет накопления нуклеаз в периплазматическом пространстве. Поэтому для получения компетентных клеток использовали культуру, которая достигала стационарной фазы роста в богатой LB-среде с интенсивной аэрацией при 25 °С.

Тем не менее попытка создать  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую компетентность клеток *E. carotovora* RC5297 при помощи стандартного протокола для *E. coli* с использованием 0,1 М  $\text{CaCl}_2$  на  $1 \cdot 10^9$  кл./мл оказалась неуспешной. Поэтому обработку клеток проводили в более жестких условиях, используя 0,1 М  $\text{CaCl}_2$  на  $5 \cdot 10^8$  кл./мл.

На LB-среде с 50 мкг/мл ампициллина после 20 ч инкубации были отобраны устойчивые клоны — трансформанты *E. carotovora* RC5297, несущие плазмиду pECL18 (рис. 2). При дальнейшей инкубации этих чашек вокруг больших колоний трансформантов появились более мелкие (см. рис. 2). Оказалось, что эти колонии, выросшие на среде с ампицил-

лином, не являются трансформантами. Хотя описанный феномен имеет самостоятельное значение, однако его можно объяснить секрецией эрвиниями  $\beta$ -лактамазы — фермента, разрушающего  $\beta$ -лактамное кольцо антибиотиков пенициллинового ряда — в окружающую среду [10].

С помощью описанного выше метода удалось достичь частоты трансформации  $2,8 \cdot 10^3$  на 1 мкг сверхспиральной ковалентнозамкнутой ДНК плазмиды pECL18, что является довольно высоким показателем для *E. carotovora* [9]. Причем полученные трансформанты оказались очень стабильными: частота потери плазмиды в отсутствие селективного прес-са составляла менее 1%. В то время как для штамма *E. carotovora* RC5297, содержащего плазмиду R68.45, частота ее потери достигала 67 % [11].

Известно, что при межвидовом и межродовом переносе плазмид характер их репликации изменяется [9]. Поэтому выделенные из трансформантов плазмиды были проанализированы в 0,8% агарозных гелях. Сравнительный анализ содержания плазмиды pECL18 в *E. coli* JM109 и в *E. carotovora* RC5297 показал, что в этих двух штаммах она реплицируется в виде двух форм — мономерной и димерной (см. рис. 1).

У некоторых трансформантов *E. carotovora* RC5297(pECL18) было проверено свойство ограничивать развитие фагов. Для этого использовали *clear*-мутанты эрвиниофага ZF40. В табл. 1 приведены показатели эффективности посева исходного и модифицированного на штамме *E. carotovora* M2-4/50RI *clear*-мутанта с5/5 фага ZF40. Незначительное уменьшение эффективности посева (в пределах одного порядка) фага ZF40 с5/5 на штамме с плазмидой pECL18 свидетельствует о наличии частично модифицированных сайтов для рестриктазы Ecl18kI на ДНК фага ZF40. В случае же модифицированного мутанта наблюдали значительное снижение эффективности посева (см. табл. 1). Эти результаты свидетельствуют о том, что плазида pECL18 нормально экспрессируется в клетках данного штамма, что приводит к синтезу рестриктазы и ограничению развития фагов за счет гидролиза их ДНК. Кроме того, из полученных результатов можно сделать вывод, что хозяйская RM-система штамма *E. carotovora* RC5297 и привнесенная с плазмидой pECL18 RM-система ведут себя автономно, т. е. ограничивают развитие фага независимо друг от друга (см. табл. 1).

Для подтверждения приведенных результатов проводили выделение нуклеаз из полученных трансформантов и контрольных штаммов. Как видно из рис. 3, нуклеаза Ecl18kI, выделенная из штамма *E. coli* JM109(pECL18), гидролизует ДНК фага  $\lambda$  более чем на 14 фрагментов. Проверку сайтспецифической эндонуклеазной активности проводили также и в лизатах клеток *E. carotovora* M2-4/50RI, RC5297 и RC5297(pECL18). Во всех этих случаях наличия явных дискретных фрагментов ДНК  $\lambda$  не обнаружено (см. рис. 3), что может быть связано с превалированием неспецифического гидролиза ДНК. Поэтому для идентификации дискретности фрагментов, полученных при гидролизе нуклеазами штамма *E. carotovora* RC5297(pECL18), была использована программа *TotalLab v.2.01*. Установлено, что на фоне продуктов неспецифического гидролиза присутствуют дискретные полосы ДНК, которые,

Таблица 1. Эффективность посева *clear*-мутантов фага ZF40 на различных штаммах *E. carotovora*

Штамм <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Эффективность посева	
	с5/5	mod с5/5
RC5297	1,0	$0,3 \cdot 10^{-6}$
RC5297(pECL18)	0,35	менее $1 \cdot 10^{-7}$
M2-4/50RI	$0,9 \cdot 10^{-5}$	1,0

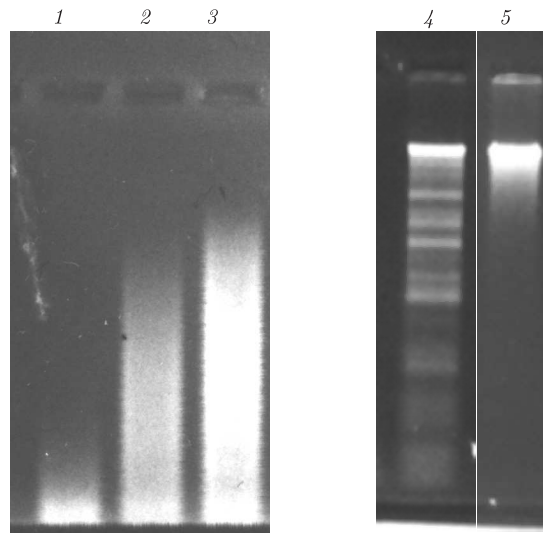


Рис. 3. Гидролиз ДНК фага  $\lambda$  нуклеазами из штаммов *E. carotovora* subsp. *carotovora* (1–3) и *E. coli* JM109 (4, 5): 1 – ECA M2–4/50RI, 2 – ECA RC5297, 3 – ECA RC5297(pECL18), 4 – *E. coli* JM109(pECL18), 5 – *E. coli* JM109

очевидно, являются рестриктами Ecl18kI. Их наличие свидетельствует об экспрессии данной эндонуклеазы в клетках трансформантов *E. carotovora* RC5297(pECL18).

Таким образом, нами изучены особенности трансформации клеток *E. carotovora* subsp. *carotovora* плазмидой pECL18 и получены трансформанты *E. carotovora* RC2597(pECL18) с частотой  $2,8 \cdot 10^3$  на 1 мкг плазмидной ДНК. Показано, что частота трансформации существенно зависит от стадии роста культуры и от количества хлорида кальция, используемого для получения компетентных клеток. Привнесенная с данной плазмидой и хозяйская RM-системы ведут себя автономно, т. е. ограничивают развитие фага независимо друг от друга. Полученные результаты являются предпосылкой для разработки биотехнологической системы на основе непатогенной для человека бактерии *E. carotovora*, ее экзогенных и эндогенных плазмид.

1. Кушклина А. И., Товкач Ф. И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2005. – **67**, № 3. – С. 50–61.
2. Товкач Ф. И. Изучение фагоустойчивости *Erwinia carotovora* с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. – 2002. – **71**, № 1. – С. 82–88.
3. Zakharova M. V., Beletskaya I. V., Denjmukhametov M. M. Characterization of pECL18 and pKPNo 2. – a proposed pathway for the evolution of two plasmids that carry identical genes for a type II restriction-modification system // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – **267**, No 2. – P. 171–178.
4. Стижланд Ю. Е. Получение зондов и их мечение // Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – Москва: Мир, 1999. – 558 с.
5. Kado C. I., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – **145**, No 3. – P. 1365–1373.
6. Белавин П. А., Дедков В. С., Дегтярев С. Х. Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий // Прикл. биохимия и микробиология. – 1988. – **24**, № 1. – С. 121–124.
7. Hu N. T., Hung M. N., Chion S. J. et al. Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xantomonas campestris* pv. *campestris* // J. Bacteriol. – 1992. – **174**, No 8. – P. 2679–2687.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1984. – 480 с.

9. Hinton J. C., Perombelon M. C., Salmond G. P. Efficient transformation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* // J. Bacteriol. – 1985. – **161**, No 2. – P. 786–788.
10. Черватюк Н. В, Товкач Ф. И. Влияние экзогенной плазмиды R68.45 на продуктивное и лизогенное развитие умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2006. – **68**, № 2. – С. 48–57.
11. Housby J. N., Thomas J. D., Wharam S. D. et al. Conditional mutations in OutE and OutL block exoenzyme secretion across the *Erwinia carotovora* outer membrane // FEMS Microbial. Lett. – 1998. – **162**, No 1. – P. 91–102.
12. Товкач Ф. И. Популяционная гетерогенность коллекционных штаммов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* и ее связь с фаговой лизогенной конверсией // Микробиология и биотехнология XXI столетия: Материалы междунар. конф. – Минск, 2002. – С. 103–104.

*Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 30.06.2006*