

КОНЪЮГАЦИОННЫЙ ПЕРЕНОС ПЛАЗМИДЫ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* В КЛЕТКИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

В. А. ЛИВИНИЦ, Е. В. СЕМЕНОВА, К. В. МАКАРЯН*

Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов,

*Ереванский зооветеринарный институт

Бактерии молочнокислые—плазмиды—конъюгация—устойчивость к антибиотикам

Получение плазмид, которые могут быть мобилизованы из *Escherichia coli* в клетки молочнокислых бактерий, открывает большие возможности для генно-инженерных манипуляций с этими бактериями и, в частности, для конструирования штаммов, устойчивых к антибиотикам. Сущность этой процедуры заключается в том, что в двурепликонную плазмиду, способную поддерживаться в клетках *E. coli* и молочнокислых бактерий, встраивают фрагмент ДНК, содержащий начало переноса, (*oriT* или *mob-сайт*) плазмиды RK2 (или родственных плазмид RP4 и RP1). Это позволяет мобилизовать полученную плазмиду с помощью конъюгативных плазмид *IncP*-группы несовместимости в клетки грамположительных бактерий [1].

В настоящей работе впервые показана возможность конъюгационной мобилизации такой плазмиды из *E. coli* в клетки лактобацилл.

Материал и методика. В работе использовали штаммы бактерий, полученные из музея культур ВНИИгенетики: *E. coli* C 600, *E. coli* C 600 (RP4), *E. coli* S 17 (pSU 5011), *Bacillus subtilis* 168 (pHV 33), *Lactobacillus plantarum* ВКМ-578, *Lactobacillus buchneri* ВКМ 1311, *Streptococcus faecalis* OG1. Двурепликонная плазма pHV 33 получена в работе [2]. Плазмида pSUP 5011 описана Саймоном [3].

Среда. *E. coli* и *B. subtilis* культивировали в бульоне Хоттингера или L-бульоне. Лактобациллы выращивали в среде MRS (Oxoid, Англия), агаризованные среды содержали 1,5% агара. Антибиотики отечественного производства вносили в среды в следующих концентрациях (мкг/мл): ампициллин—100,0; хлорамфеникол—10,0; тетрациклин—10,0; канамицин—20,0; полимиксин—10,0. Трансформацию клеток *E. coli* осуществляли известным методом [4]. Конъюгационные скрещивания между *E. coli* и молочнокислыми бактериями осуществляли на фильтрах. С этой целью 1 мл ночной культуры штамма-донора *E. coli* C 600 (RP4, pSI.201) и 0,2 мл ночной культуры штамма-реципиента смешивали и осаждали на мембранном фильтре с диаметром пор 0,45 мкм. Фильтры с клетками помещали на чашки с соответствующими питательными средами и инкубировали 18 ч при 37° или 30°. Затем клетки смывали с фильтров физиологическим раствором NaCl и высевали на селективные среды для отбора эксконъюгантов. Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* и *B. subtilis* выделяли по методу Бирибойна и Доли [5]. Рестрикцию и лигирование ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками [4] в условиях, рекомендованных изготовителями ферментов. Ферменты получали в лаборатории прикладной энзимологии ВНИИген.

Результаты и обсуждение. Конструирование плазмиды pSL201. Двурепликационная плазмида pHV33 имеет размер 6,9 т. п. о и состоит из фрагмента ДНК плазмиды pBR322, несущей детерминанты устойчивости к ампициллину и тетрациклину, и фрагмента плазмиды pC194, несущей детерминант устойчивости к хлорамфениколу [2]. Как известно, плазмида pBR322 поддерживается в клетках *E. coli*, а плазмида pC194 — в клетках грамположительных бактерий. Плазмида pHV33 содержит уникальные сайты для рестриктаз Bam H I, EcoR I и Pst I. Для получения мобилизуемой плазмиды на основе pHV33 в нее был встроены фрагмент ДНК, несущий *oriT* (mob-сайт) плазмиды RP4. Источником mob-фрагмента служила плазмида pSUP5011 [3]. С этой целью плазмиду pSUP5011 подвергали гидролизу рестриктазой Bam H I. Mob-фрагмент выделяли из легкоплавкой агарозы после электрофоретического разделения рестриктон и препаративном 1%-ном геле с использованием гексацидтриаммоний бромид [6]. Далее 1 мкг ДНК плазмиды pHV33, обработанной рестриктазой Bam H I, смешивали с 5 мкг ДНК mob-фрагмента, добавляли 15 ед. ДНК-лигазы фага T4 и инкубировали 4 ч при комнатной температуре [4]. Полученной лигированной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* C600. Трансформанты отбирали на среде с ампициллином и среди них находили клоны, чувствительные к тетрациклину, детерминанты устойчивости к которому инактивируются, если произошла вставка mob-фрагмента в Bam H I сайт плазмиды pHV33.

Рестрикционный анализ плазмидных ДНК, выделенных из таких бактерий, показал наличие в некоторых из плазмид фрагментов ДНК, соответствующих pHV33 и mob-участку. Одна из таких плазмид была обозначена pSL201 и имела размер 8,8 т. п. о.

Конъюгационная мобилизация плазмиды pSL201 в клетки молочнокислых бактерий. Для конъюгационной мобилизации плазмиды pSL201 в клетки молочнокислых бактерий был сконструирован донорный штамм *E. coli* C600, содержащий эту плазмиду и конъюгативную плазмиду — мобилизатор RP4. Конъюгационные скрещивания осуществляли на мембранных фильтрах. Для контрселекции донора использовали природную устойчивость бацилл, лактобацилл и стрептококков к полимиксину.

Контрольный эксперимент показал, что плазмида pSL201 мобилизуется из *E. coli* в *B. subtilis*, где поддерживается в присутствии селективного агента (хлорамфеникола). Затем в качестве реципиентов были взяты молочнокислые бактерии *L. plantarum* ВКМ578, *L. buchneri* ВКМ1310 и *Str. faecalis* OG1. Эксконъюганты молочнокислых бактерий, устойчивые к хлорамфениколу, возникали с частотой 10^{-3} — 10^{-4} по отношению к числу клеток донора. Эксконъюганты *Str. lactis* возникали с частотой $< 5 \cdot 10^{-5}$.

Присутствие плазмиды pSL201 в клетках эксконъюгантов подтверждает анализ препаратов плазмидных ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Кроме того, полученные препараты плазмиды ДНК, выделенные из *L. plantarum*, *L. buchneri* и *Str. faecalis* использовали для трансформации штамма *E. coli* C600. Трансформанты отбирали

на среде с ампициллином. Последующий рестрикционный анализ плазмидных ДНК из этих трансформантов *E. coli* подтвердил наличие в них неизменной формы pSI.201.

Как уже отмечалось, экзонъюганты молочнокислых бактерий отбирали на среде с хлорамфениколом. Следовательно, детерминант (ы) устойчивости к этому антибиотику экспрессируется в клетках лактобацилл и фекальных стрептококков. В то же время эти бактерии оставались чувствительными к ампициллину, т. е. детерминант устойчивости к этому антибиотику не экспрессируется в клетках молочнокислых бактерий.

После культивирования в неселективных условиях (т. е. без антибиотиков) в течение 15—20 генераций более 99% клеток лактобацилл и стрептококков утрачивали плазмиду pSI.201. Это соответствует наблюдению, что исходная плазмида pIV33 не стабильна в клетках грамположительных бактерий [2].

Таким образом, проделанная работа показывает перспективность использования мобилизуемых плазмид для введения детерминантов устойчивости в клетки молочнокислых бактерий. Однако для стабильности этих признаков, видимо, целесообразно использовать дуплеконные плазмиды иного происхождения и, в частности, сконструированные на основе собственных плазмид молочнокислых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Trissu—Cust P., Carlier C., Martin P., and Courvillat P. FEMS Microbiol. Lett., 48, 289—291, 1987.
2. Primrose S. B., Ehrlich S. D. Plasmid, 6, 193—201, 1981.
3. Simon R. Mol. Gen. Genet., 196, 113—120, 1984.
4. Маннатиц Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: пер. с англ. М., 1984.
5. Birnboim H. D., Doly F. Nucl. Acids Res., 7, 1513—1523, 1979.
6. Langridge F., Langridge T., Bergquist J. Biochemistry, 103, 264—271, 1980.

Поступило 8.1.1990 г.