

ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ EZ::TN5 < R6K γ ORI/KAN-2 > TNP ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНСЕРЦИОННЫХ МУТАНТОВ *BURKHOLDERIA MALLEI*

**Е. В. Молчанова^{1, 2}, Я. А. Лопастейская^{1, 2}, Т. Н. Шаров¹, Н. П. Агеева¹,
Д. В. Викторов^{1, 2}, А. В. Топорков^{1, 2}**

¹Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

²Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Кафедра молекулярной биологии и генетики

Показана возможность использования системы EZ::TN5 < R6K γ ori / KAN-2 > Tnp для транспозонного мутагенеза штаммов *Burkholderia mallei*. Определены условия проведения трансформации методом электропорации и исследован спектр фенотипических признаков, измененных у полученных мутантов *B. mallei* в результате транспозонных инсерций (устойчивость к антибиотикам и красителям, питательные потребности, изменения в биохимической активности и белковых масс-спектрах, уровень цитопатогенности для *Peireskia aculeata*).

Ключевые слова: *Burkholderia mallei*, EZ::TN5 < R6K γ ori / KAN-2>Tnp, транспозонный мутагенез, электропорация.

APPLICATION OF EZ::TN5 < R6K γ ORI / KAN-2 > TNP KIT TO OBTAIN INSERTIONAL *BURKHOLDERIA MALLEI* MUTANTS

**E. V. Molchanova^{1, 2}, J. A. Lopasteyskaya^{1, 2}, T. N. Sharov¹, N. P. Ageeva¹,
D. V. Viktorov^{1, 2}, A. V. Toporkov^{1, 2}**

¹FSHI «Volgograd Scientific Research Plague Control Institute» of Federal Supervision Agency for Customer Protection and Human Welfare,

²SFEE HPE «Volgograd State Medical University» of the Ministry of Public Health of the Russian Federation, Department of Molecular Biology and Genetics

The article discusses the possibility of using EZ::TN5 < R6K γ ori/KAN-2 > Tnp kit for transposon mutagenesis of *Burkholderia mallei* strains. We described the specific conditions for transformation using electroporation. We studied a range of phenotypic traits of the obtained *B. mallei* mutants. Changes associated with antibiotic and dye resistance as well as changes in nutrient requirements, biochemical activity and protein mass specters and cytopathogenicity for *Peireskia aculeata* were found to be the effects of transposon insertion.

Key words: *Burkholderia mallei*, EZ::TN5 < R6K γ ori/KAN-2 > Tnp, transposon mutagenesis, electroporation.

B. mallei является возбудителем тяжелого заболевания человека и животных — сапа и относится ко второй группе патогенности. В настоящее время проведено полное секвенирование геномов отдельных штаммов этого микроорганизма [9], однако завершенная функциональная аннотация генома *B. mallei* требует дополнительных исследований роли отдельных генетических детерминант.

Транспозонный мутагенез широко используется для изучения функций отдельных генов и механизмов клеточных процессов. Традиционные методики инсерционного мутагенеза основывались на конъюгационной передаче в клетки исследуемого вида микроорганизма плазмиды, несущей в своем составе транспозон и последующей элиминации вектора. Таким способом ранее нами были получены инсерционные мутанты *B. mallei* посредством передачи плазмиды (pSUP5011), несущей транспозон *Tn 5*, от *Escherichia coli* S 17-1 [1]. Недостатками использованного подхода были значительная временная продолжительность экспериментов и необходимость в подборе условий для последующей элиминации суицидного вектора и селективных сред для исключения роста донорного штамма.

В настоящее время для высокоэффективного направленного мутагенеза применяются готовые транспозонные конструкции на основе векторов с высокой частотой передачи и встройки. Такие конструкции, в частности, входят в состав коммерческих наборов для *in vitro* мутагенеза EZ-Tn5TM <R6K γ ori/KAN-2(DGFR)>TransposomeTMKit (Epicentre, США) и включают рекомбинантный вектор на основе транспозона Tn5 с областью начала репликации R6K γ ori *E. coli* детерминантами резистентности к канамицину (<R6K γ ori/KAN-2>) или триметоприму (<DGFR>), а также транспозазу EZ-Tn5TM Transposase, обеспечивающую высокую частоту инсерций транспозона в целевую последовательность при электропорационной передаче и набор секвенационных праймеров для анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК, фланкирующих область инсерции [5, 6, 7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка эффективности системы EZ::TN5<R6K γ ori/KAN-2>Tnp для получения инсерционных мутантов *B. mallei* и их первичная фенотипическая характеристика.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериальные штаммы. В качестве исходного при получении инсерционных мутантов был использован штамм *B. mallei* Ц-5 дикого типа. Штамм *E. coli* CCUG (Culture Collection, University of Goteborg, Швеция) использовался в качестве контрольного при масс-спектрометрическом профилировании бактериальных клеток. Культуры микроорганизмов выращивали на питательном агаре (Nutrient agar, Himedia; L-agar, Difco) и в питательном бульоне (Nutrient broth, Himedia) при температуре 37 °С.

Определение уровня антибиотикорезистентности. Минимальные подавляющие концентрации (МПК) офлоксацина, тетрациклина, канамицина, хлорамфеникола, цефоперазона определяли на агаре Мюллер-Хинтон (Himedia) методом серийных разведений.

Инсерционный мутагенез. В микроцентрифужных пробирках в 40 мкл охлажденного 10%-го глицерина ресуспендировали клетки 18 ч агаровой культуры *B. mallei* Ц-5 до плотности 1×10^9 м.к./мл, смешивали с 1 мкл стокового раствора EZ::TN5<R6Kγori/KAN-2>Tnp, смесь переносили в охлажденные 1-мм кюветы и проводили электропорацию на приборе MicroPulser™ Electroporator (Bio-Rad) при напряжении в 1,8 kV с 3-кратным импульсом. Далее сразу же в кювету добавляли 1.0 мл N-бульона, ресуспендировали и переносили взвесь в культуральные пробирки для подрачивания при 37 °С в течение 24 ч. Затем по 0,1 мл высевали на селективные среды (канамицин 2,5 мкг/мл) и рассчитывали частоту инсерции по соотношению числа выросших клонов на селективных средах к общему числу клеток в инокуляте.

У полученных клонов *B. mallei* Ц-5, несущих транспозонные инсерции, определяли уровень приобретенной резистентности к антибиотику, детерминируемому генами транспозона (канамицин).

Биохимическая активность. Активность штаммов в отношении 23 биохимических субстратов исследовали на планшетах Micronault IDS на микробиологическом анализаторе MICROTAX (SY-Lab, Австрия) в соответствии с инструкциями производителя.

Масс-спектрометрическое профилирование. Из 18 ч культур буркхольдерий, выросших на L-агаре, готовили взвеси в 300 мкл ультрачистой воды для ВЭЖХ (Rapraeas, Испания) в микроцентрифужных пробирках, объемом 1,5 мл. Материал тщательно суспендировали для достижения максимально гомогенизированной взвеси. Затем в пробирки с препаратами добавляли по 900 мкл абсолютного этанола, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение получаса. После экспозиции центрифугировали 2 минуты при 13000 об./мин, удаляли супернатант, высушивали на воздухе. Потом в пробирки вносили по 50 мкл 70%-го раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила и снова перемешивали. Материал в объеме 1 мкл наносили на лунки мишени. На каждую пробу добавляли по 1 мкл матрицы для MALDI-TOF (α -циано-гидроксикоричная кислота в ра-

створе 50%-го ацетонитрила и 2,5%-й трифторуксусной кислоты). После кристаллизации проб мишень с образцами помещали в камеру масс-спектрометра Axima Confidence™ (Shimadzu, Япония). Регистрацию масс-спектров осуществляли в диапазоне 1500—12000 m/z, фиксировались только положительные ионы, суммарный спектр каждого образца составлялся на основе 100 единичных импульсов. Все масс-спектры регистрировали в линейном режиме, без использования рефлектрона.

Определение цитопатогенности. Уровень цитопатогенного эффекта штаммов определяли с помощью растительной модели *P. aculeata* [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При электропорационной передаче в штамм *B. mallei* Ц-5 системы EZ::TN5<R6Kγori/KAN-2>Tnp были получены 8 инсерционных вариантов, резистентных к канамицину. Частота образования мутантов составила $n \times 10^{-6}$.

Мутанты *B. mallei* Ц-5 характеризовались наибольшими изменениями в уровне устойчивости к канамицину и тетрациклину (рис. 1). При этом резистентность к препарату аминогликозидного ряда возросла в несколько раз, а уровень устойчивости к тетрациклину повысился в 2,5 раза у клона № 5 и снизился в 2 раза у вариантов № 6, 7, 8. Устойчивость к хлорамфениколу, офлоксацину и цефоперазону демонстрировала некоторую тенденцию к снижению.

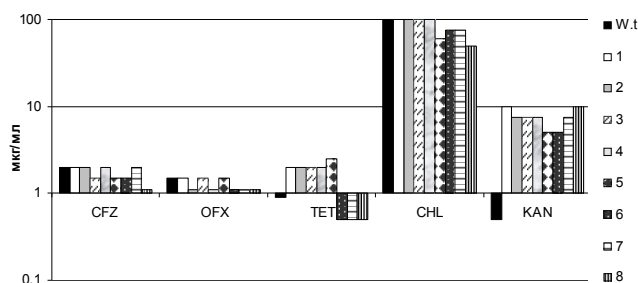


Рис. 1. Антибиотикорезистентность инсерционных вариантов *B. mallei* Ц-5: W.t — *B. mallei* Ц-5; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 — инсерционные варианты *B. mallei* Ц-5; CHL — хлорамфеникол, KAN — канамицин, TET — тетрациклин, OFX — офлоксацин, CFZ — цефоперазон

Определение питательных потребностей по схеме Холлидея показало, что включение транспозона *Tn5* индуцировало у двух клонов (№ 6, 7) мутации зависимости от триптофана и гистидина. Мутант № 2 давал рост при добавлении в минимальную среду глутамата, глутамин, аргинина, пролина, что позволило предположить у него зависимость от их общего предшественника α -оксоглутарата (табл.).

Характер роста полученных клонов *B. mallei* на среде с основным фукусином выявил различия у 6 мутантов по сравнению с диким штаммом, которые снизили резистентность и характеризовались отсутствием роста на этих средах.

Адсорбция клетками колоний липофильного красителя судана черного объясняется отсутствием продукции экранирующего гидрофильного экзополисахарида [8]. Так, клетки исходного штамма *B. mallei* Ц-5 не обладали способностью к окрашиванию данным красителем, однако 2 транспозонных варианта (№ 3 и № 5) приобрели такую способность.

Фенотипическая характеристика инсерционных вариантов штамма *B. mallei* Ц-5

Штаммы <i>B. mallei</i> Ц-5	Питательные потребности	Рост на среде с фуксином	Адсорбция судана черного
№ 1	прототроф	+	-
№ 2	α -оксоглутарат	-	-
№ 3	прототроф	++	+
№ 4	прототроф	+	-
№ 5	прототроф	++	+
№ 6	триптофан	-	-
№ 7	гистидин	-	-
№ 8	прототроф	+	-
W.t.	прототроф	++	-

Примечание. «+++» — сливной рост колоний, «+» — рост отдельных колоний, «-» — отсутствие роста.

В результате проведенного анализа было установлено, что изменения в биохимических свойствах у по-

лученных мутантов по сравнению с исходным штаммом касались в первую очередь уреазной активности. Так, у трех транспозонных вариантов (№ 1, 3 и 8) способность к утилизации мочевины была утрачена.

Следует отметить, что наблюдалось также повышение хитиназной и фосфодиэстеразной активности у мутантов по сравнению с продукцией этих ферментов у исходного штамма.

При сравнительном анализе масс-спектров клеточных белков транспозонных вариантов и исходного штамма *B. mallei* Ц-5 были выявлены изменения в экспрессии протеинов с молекулярными массами 5203.3, 5243.9, 6560.1, 7578.9, 8155.1 Да. Дендрограмма сходства масс-спектров исследованных штаммов показала, что наиболее близкими по белковым профилям к штамму дикого типа являются мутанты № 6, 7 и 8 (рис. 2).

Штаммы, отличающиеся от исходного по белковым профилям, характеризовались измененной цитопатогенностью. Так, дикий штамм *B. mallei* Ц-5 вызывал почернение и изъязвление листовой пластинки *P. aculeata* по месту надреза с отсутствием мацерации. Повреждения тестового растения инсерционными мутантами *B. mallei* были менее выраженными и отличались между собой. Варианты № 2, 6 и 7 не обладали цитопатогенным эффектом, а клон № 4 вызывал повреждения листовой пластинки легкой степени (рис. 3).

В данном исследовании на модели *B. mallei* был впервые применен транспозонный комплекс на основе

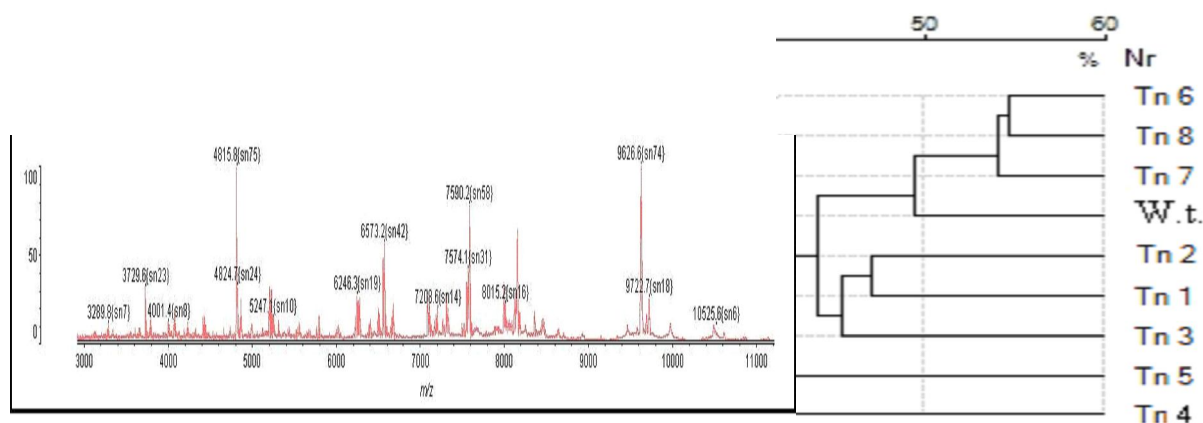


Рис. 2. Дендрограмма сходства, основанная на масс-спектрах инсерционных вариантов штамма *B. mallei* Ц-5

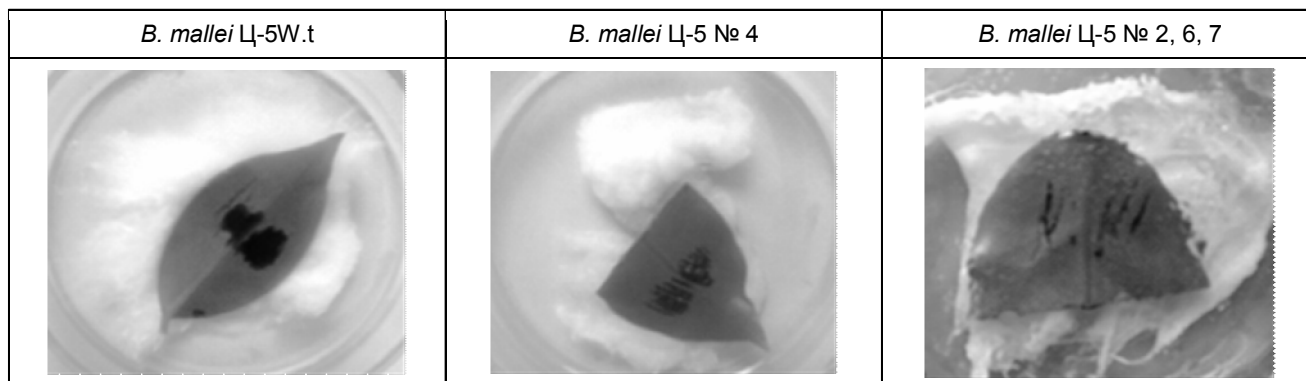


Рис. 3. Цитопатогенность штаммов *B. mallei* Ц-5 для растения *P. aculeata*

EZ-Tn5TM, содержащий ген устойчивости к канамицину для получения транспозонных мутантов посредством электропорации. Также нами была несколько модифицирована методика электропорационной передачи вектора — бульонная среда для выращивания реципиентного штамма была заменена на плотную для исключения этапа центрифугирования и отмывания клеток.

Все известные штаммы *B. mallei* характеризуются чувствительностью к антибиотикам аминогликозидного ряда (гентамицину, канамицину), тетрациклинам (тетрациклину, доксициклину) и устойчивостью к полимиксинам и пенициллинам [1, 10]. Инсерционные варианты, полученные в данной работе, характеризовались резистентностью к канамицину, опосредованную генами транспозона Tn5. Снижение устойчивости к хлорамфениколу, офлоксацину, цефоперазону, тетрациклину у вариантов № 3—7 может быть обусловлено встройкой транспозона в сайт геной последовательности непосредственно детерминант резистентности или контролирующих их экспрессию элементов. Увеличение резистентности к тетрациклину у одного из мутантов (№ 5) может предполагать вовлечение различных механизмов ее формирования благодаря геномным перестройкам из-за инсерции транспозона.

Известно, что транспозон Tn5 не является сайт-специфичным и обладает способностью включаться в различные локусы репликонов. Разнообразие полученных фенотипических классов мутантов свидетельствует об эффективной встройке транспозона в регионы различных детерминант биосинтеза и метаболических путей (приобретение ауксотрофности, утрата экспрессии отдельных ферментов, изменение отношения к красителям, изменения в продукции структурных клеточных белков).

Известна взаимосвязь повышения антибиотикорезистентности и снижения вирулентности у бактериальных видов, в том числе и у патогенных *Burkholderia* [2]. В предыдущих исследованиях на модели золотистых хомячков и перитонеальных макрофагов морской свинки *in vitro* было показано, что инсерция транспозона Tn5 в хромосому сопровождалась снижением вирулентности [1]. Аналогичное снижение вирулентных свойств было выявлено и у инсерционных мутантов *B. mallei*, полученных электропорацией. Так, варианты № 2, 6 и 7 оказались авирулентными для растительной модели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выполненное исследование продемонстрировало возможность использования системы EZ::TN5<R6K_{ori}/KAN-2>Tnp для эффективного транспозонного мутагенеза штаммов *B. mallei* с помощью электропорации. Сравнительный анализ выявил преимущества работы с этой системой (простоту и быстрое получение результатов) по сравнению с традиционным методом конъюгационной передачи транспозо-

нов. Дальнейшая работа в данном направлении предполагает разработку систем направленного мутагенеза, создание библиотек мутантных клонов с нокаутированными отдельными генами и выяснение особенностей механизмов их экспрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агеева Н. П., Меринова Л. К., Викторов Д. В., Плеханова Н. Г. Фенотипическая характеристика мутантов *Burkholderia mallei*, дефектных по синтезу внеклеточных протеолитических ферментов // Вестник ВолГМУ. — 2005. — № 2. — С. 11—15.
2. Калинин Е. В., Агеева Н. П., Меринова О. А. и др. Фенотипические свойства мутантов патогенных *Burkholderia*, резистентных к фторхинолонам и цефалоспорином // Проблемы особо опасных инфекций. — 2008. — № 96. — С. 32—35.
3. Молчанова Е. В., Агеева Н. П. Использование фитопатогенного эффекта для изучения вирулентности *Burkholderia* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2014. — Т. 158, № 10. — С. 522—525.
4. Молчанова Е. В., Агеева Н. П. Способ косвенной оценки вирулентности штаммов патогенных буркхолдерий по признаку цитопатогенности / Патент на изобретение № 2485182 от 23 января 2012 г.
5. Чепусюк Н. В., Прокулевич В. А. Направленный инсерционный мутагенез структурных генов биотинового оперона у бактерий вида *Bacillus subtilis* // Вестник БГУ. — Сер. 2. — 2008. — № 3. — Стр. 50—54.
6. Dogra, T., Priyadarshini A., Kanika, et al. Construction and characterization of random mutant library using Tn5 transposome in *Mesorhizobium ciceri* Ca181 // International Journal of Agricultural Science and Research. — 2014. — Vol. 4. — P. 101—106.
7. Garcia-Contreras R. Unraveling resistance mechanisms against new antimicrobials using transposon mutagenesis // Clon.Transgen. — 2013. — Vol. 2, № 3. 10.4172/2168-9849.1000115
8. Liu M., Gonzales J. E., Willis L. B., Walker G. C. A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64. — P. 4600—4602.
9. Nieman W. C., DeShazer D., Kim H. S. et al., Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2004. — Vol. 101, № 39. — P. 14246—14251.
10. Saqib M., G. Muhammad, A. Naureen, et al. Disc diffusion based *in vitro* antibiotic susceptibility of recent isolates of *Burkholderia mallei* // Int. J. Agric. Biol. — 2010. — Vol. 12. — P. 777—780.

Контактная информация

Молчанова Елена Владимировна — к. б. н., с. н. с. лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, ассистент кафедры молекулярной биологии и генетики Волгоградского государственного медицинского университета, elenakalinki@yandex.ru