

10. Kumar A., Zhang J., Yu F. S. Innate immune response of corneal epithelial cells to *S. aureus* infection: role of peptidoglycan in stimulating proinflammatory cytokine secretion // Invest. Ophthalmol. Vis. – 2004. – **45**, No 10. – P. 3513–3522.
11. Kato I., Canzian F., Plummer M., Franceschi S. et al. Polymorphisms in Genes Related to Bacterial Lipopolysaccharide / Peptidoglycan Signaling and Gastric Precancerous Lesions in a Population at High Risk for Gastric Cancer // Dig. Dis. Sci. – 2007. – **52**, No 1. – P. 254–261.
12. Nitta Y., Sugita T., Ikuta Y., Murakami T. Inhibitory effect of liposomal MDP-Lys on lung metastasis of transplantable osteosarcoma in hamster // Oncol. Res. – 2000. – **12**, No 1. – P. 25–31.
13. Srividya S., Roy R. P., Basu S. K., Mukhopadhyay A. Selective activation of antitumor activity of macrophages by the delivery of muramyl dipeptide using a novel polynucleotide-based carrier recognized by scavenger receptors // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 2000. – **268**, No 3. – P. 772–777.
14. Yoo Y. C., Saiki I., Sato K., Azuma I. MDP-Lys(L18), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide, inhibits the metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumours in mice // Vaccine. – 1994. – **12**, No 2. – P. 160–175.
15. Karpoff H. M., Jarnagin W., Delman K., Fong Y. Regional muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine administration enhances hepatic immune function and tumor surveillance // Surgery. – 2000. – **128**, No 2. – P. 213–218.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
Інститут експериментальної патології,
онкології та радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

Надійшло до редакції 20.02.2008

УДК 579.842.1/.2:579.252

© 2008

Ж. Ю. Сергеева, Ф. И. Товкач

Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora*

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

The study of a plasmid composition of 54 Erwinia carotovora's strains of different origins shows that 30% of these strains contain different extrachromosomal DNAs. These genetic elements belong to four discrete size classes. For the first time, the correlation of strains' plasmid maintenance and their belonging to a certain ecological niche is shown, and their sensibility to bacteriophages is studied. The restriction analysis of plasmids from the most widespread class detects a homology of E. carotovora's extrachromosomal elements. Any correlation between strains' plasmid maintenance and the killer activity of carotovoricines of E. carotovora's strains is not found.

Причастность таких автономных генетических элементов, как плазмиды и бактериофаги, к патогенности разнообразных микробов является неоспоримым научным фактом современной бактериологии. Тем не менее у важной фитопатогенной бактерии *Erwinia*

carotovora он достоверно не установлен, хотя внехромосомальные ДНК являются неотъемлемым атрибутом ее экологии. Плазмиды *E. carotovora* относятся к разряду криптических по причине отсутствия каких-либо данных относительно их физиологических функций. Одним из наиболее изученных генетических элементов бактерии *E. carotovora* является плазида рСА25 [1]. Полученные данные свидетельствуют в пользу ее профаговой природы [2].

В рамках проведенного исследования мы попытались расширить набор плазмид *E. carotovora* с целью возможного выявления элементов, аналогичных по размеру и природе профаговому элементу рСА25. В задачи работы входило также обнаружение связи внехромосомных ДНК с другими генетическими элементами и выявление корреляции плазмидного содержания с персистированием штаммов ервиний в определенной экологической нише.

В работе были использованы фитопатогены из различных коллекций [3, 4]: *E. carotovora* subsp. *carotovora* — 48 А, 75, 144 а, 482 Е, 741, 808 а, 7869, NCPPB 550, 718, 566 ВКМ, 246, 915, 184, 2, 48П, 53П, 91П, 921, 2054, ATCC 27388 = NCPPB 1065, G 147, G 117, 258, 133, 5, 180, 495, ATCC 15713^T = NCPPB 312^T, NCPPB 438, SR165, E193, 162, 209, Сс 110, 33 А, 13 А/15, 4', 9', 10', 11', 16', 18', 3', 15', 23'; *E. carotovora* subsp. *atroseptica* — 58 А, NCPPB 549^T = ATCC 33260^T, 9 Ф, g217, 5 А, 37 А, 40 А, 46 А, 194-8; *E. carotovora* subsp. *toxica* — 47 а, К-47, а также *Escherichia coli* — К12 (F), J53 (RP4) и *Agrobacterium tumefaciens* — C58 (pTi-C58). Плазмиды pTi-C58 (188 т. п. н.), F (100 т. п. н.) и RP4 (60 т. п. н.) использованы как маркеры при определении размеров больших внехромосомных ДНК ервиний.

Скрининг штаммов *E. carotovora* на наличие плазмидной ДНК проводили, используя щелочной метод [5] со следующей модификацией. Суспензию бактериальных клеток готовили из суточных колоний, перенося клетки микробиологической петлей в 100 мкл буфера Е, который содержал 40 мМ *трис*-ацетата, рН 7,9, и 2 мМ Na₂ЕДТА. Затем ее перемешивали с двумя объемами лизисного раствора (50 мМ *трис*-NaCl, рН 12,6, 3% додецил сульфата натрия). Препараты нагревали в ультратермостате на протяжении 60 мин при 60 °С и после этого обрабатывали смесью кислого фенола и хлороформа (1 : 1 по объему). После центрифугирования смесей в микроцентрифуге при 11000 об/мин в течение 5–10 мин водную фазу осторожно отбирали и анализировали на наличие плазмидной ДНК. Использовали 0,7%, 0,8% и 0,9% агарозный гель и электрофоретический буфер Е. Напряженность электрического поля составляла 6–10 В/см. Время разделения — 4–7 ч.

Для установления фагочувствительности штаммов *E. carotovora* были использованы колифаги Т4 и Р1, а также вирулентный мутант с5/5 фага ZF40. Для этого на верхний слой полужидкого агара, содержащего бактериальные клетки, наносили суспензию фага в объеме 5 мкл. После высыхания жидкости чашки переворачивали и культивировали 24 ч при 28 °С. Учет результатов производили после образования негативных пятен лизиса на газоне культуры. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *HpaI* и *EcoRV*.

В результате исследования плазмидного состава 54 штаммов *E. carotovora* различного происхождения обнаружено, что многие из них несут плазмиды. В редких случаях выявить плазмидоносительство штамма не представлялось возможным из-за наличия в его клетках высокой нуклеазной активности (рис. 1, дорожка 12).

Установлено, что 17 из 54 исследованных штаммов содержат плазмиды различных размеров. Этот результат совпадает с приведенными ранее данными о том, что 30% штам-

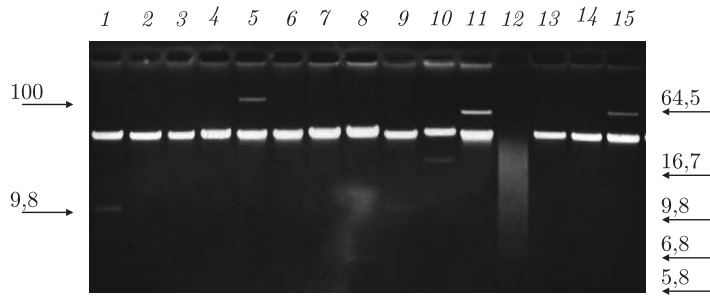


Рис. 1. Плазмидные спектры *E. carotovora* subsp. *carotovora*: 566 ВКМ (1), 495 (8), 246 (9), 184 (13), АТСС 15713^Т (15); *E. carotovora* subsp. *atroseptica*: 9Ф (10); *E. coli*: К12 (F) (5), J53 (RP4) (11). Клетки выращивали на полноценной питательной среде в течение 1 сут. Агароза 0,8%. Здесь и на рис. 2 и 3 стрелками указаны внехромосомные ДНК и их размер в т. п. н.

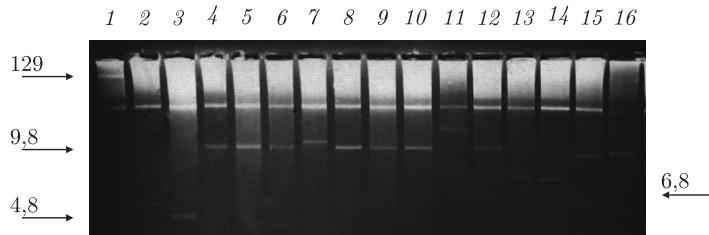


Рис. 2. Электрофореграмма плазмидных ДНК *E. carotovora* subsp. *carotovora*: 33 А (1), 495 (2), 3' (3), 2 (4), 75 (5), 48 А(рСА25) (6), 921 (7), G147 (8), 718 (9), 566 ВКМ (10), 48 А(рСА25::Тn9) (11), 246 (12), 184 (13), 16' (14), 23' (15) 4,8 – 13,7 т. п. н. и *E. coli* (рLOF) (16)

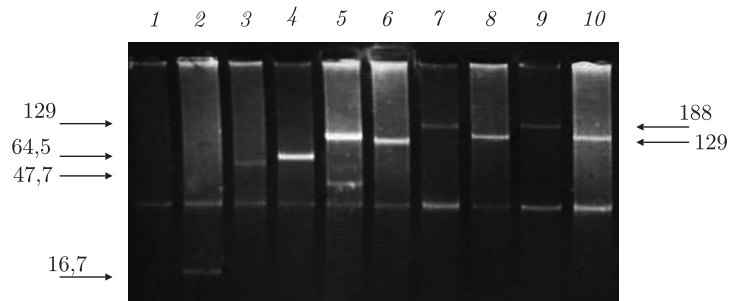


Рис. 3. Электрофореграмма больших плазмид *E. carotovora* subsp. *carotovora*: 194–8 (1), АТСС 15 713^Т (4), 33 А (129 т. п. н.) (10); *E. carotovora* subsp. *atroseptica*: 9Ф (2), NCPPB 549^Т (5), g217(8); *E. coli*: J53 (RP4) (3), К12 (F) (6); *A. tumefaciens* C58 (рTi-C58) (7, 9)

мов ервиний содержат плазмиды [6]. Обнаруженные плазмиды ервиний принадлежат к четырем дискретным размерным классам: 2,5–6,8, 9,8–16,7, 47,7–64,5 и 129 т. п. н. Приблизительно 50% выделенных плазмид *E. carotovora* относятся ко второму дискретному классу и имеют размер 9,8 т. п. н. (рис. 2). Этот размер совпадает с размером внехромосомного элемента рСА25 [1, 6]. Более 50% из штаммов плазмидосодержащих бактерий оказались чувствительными к киллерному действию фага Т4 *E. coli*, тогда как колифаг Р1 убивал лишь единичные штаммы.

Следующими по частоте встречаемости в клетках ервиний следуют большие плазмиды размером 129 т. п. н. (рис. 3). Наличие плазмид размером 47,7 и 64,5 т. п. н. обнаружено в единичных случаях. Плазмида размером 47,7 т. п. н. характерна для штамма

NCPPB 549^T = ATCC 33260^T, тогда как плаزمида размером 64,5 т. п. н. характерна для штамма ATCC 15713^T = NCPPB 312^T.

Впервые выявлено, что плазмиды *E. carotovora* одного и того же размерного класса встречаются в штаммах, изолированных из определенной экологической ниши. Половина штаммов, несущих плазмиду размером 9,8 т. п. н. или ее варианты, были из российских коллекций. Остальные штаммы этой группы были из Армении и Румынии. А штаммы ервиний из Канады оказались бесплазмидными. За единичными исключениями украинские и белорусские штаммы, использованные в данном исследовании, также оказались бесплазмидными. Большие плазмиды обнаружены в штаммах из чешской и бельгийской коллекций микроорганизмов.

Мы изучали возможную причастность внехромосомных элементов *E. carotovora* к определению чувствительности к бактериофагам ZF40 с5/5 *E. carotovora*, P1 и T4 *E. coli*. Исследования показали, что 25% плазмидных и 37% бесплазмидных штаммов *E. carotovora* чувствительны к инфицированию ервиний фагом ZF40 с5/5. Обнаружено также, что 70% штаммов, чувствительных к киллерному действию фага T4 *E. coli*, содержат плазмиды. Это позволяет сделать предположение об участии плазмид в формировании клеткой фаговых адсорбционных рецепторов. Небольшая группа штаммов оказалась чувствительной к убийству извне фагом P1. Однако это свойство в равной мере характеризует как плазмидные, так и бесплазмидные штаммы. Среди бактерий, содержащих большие плазмиды, не выявлено ни одного штамма, чувствительного к бактериофагам ZF40 с5/5, T4 и P1.

Внехромосомные ДНК, выделенные из клеток *E. carotovora*, которые культивировались в минимальной питательной среде А с 1% пектина в течение 48 ч, обычно содержат в значительно меньшей степени примеси хромосомной ДНК, РНК и белков, чем таковые, выращенные на среде LB. Эти образцы были использованы для рестрикционного анализа внехромосомной ДНК ервиний.

Рестрикционный анализ внехромосомных ДНК *E. carotovora* штаммов 48 А(pCA25), 2, 75, 921, G 147, 718, 566 ВКМ, 48 А(pCA25::Tn9), 246, 184 с помощью эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* показал, что эти элементы являются гомологичными по сайтам рестрикции. При этом разница в размере фрагментов, полученных в результате рестрикции, объясняется, как и изначальная разница в размерах плазмид, наличием мутаций вставочно-делеционного типа.

В последующих исследованиях мы не выявили связи плазмидного спектра штаммов *E. carotovora* с киллерной активностью каротоворицинов, которые они синтезируют при лизогенной индукции клеток (табл. 1). В зависимости от киллерной активности бактериоцинов относительно 10 индикаторов штаммы *E. carotovora* можно разделить на три группы. При этом в каждую группу входят штаммы, содержащие плазмиды различного размера. Таким образом, размер внехромосомного элемента штамма не коррелирует с активностью его бактериоцина. В качестве контроля в каждой группе мы использовали бесплазмидные штаммы с аналогичным спектром киллерной активности. Установлено, что наличие либо отсутствие в штамме плазмиды не оказывает влияния на активность каротоворицинов. Эти данные подтверждают предположение о том, что внехромосомные элементы *E. carotovora* не несут гены, кодирующие синтез каротоворицинов [3, 4].

Таким образом, содержание плазмид является широко распространенным явлением для фитопатогенной бактерии *E. carotovora*. Плазмидосодержание штаммов связано с экологическими нишами, в которых они персистируют. Не исключена возможность, что плазмиды принимают участие в формировании рецепторов к бактериофагам. Идентификация плазмид

Таблица 1. Связь плазмидного спектра с киллерной активностью каротоворицинов

Бактериоцин*	Размер плазмиды, (т. п. н.)	Индикаторный штамм**										Группа***
		55	50	18	41	11	5	57	32	35	12	
Еса 23'	8,7	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	I
Еса 495	5,8	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
Еса 16'	6,8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Еса 48А	9,8	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	
Еса 7869	б/п	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	
Еса 718	9,8	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	II
Еса 3'	4,8	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	
NCPPB 550	б/п	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
Еса 246	9,8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III
Еса 75	9,8	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Еса 2	9,8	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
ATCC 15713 ^T	64,5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
566 ВКМ	9,8	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
Еат 9Ф	16,7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Еса 184	6,8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Еса SR165	б/п	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	

Примечание. б/п — бесплазмидный штамм; “+” — лизис; “-” — отсутствие лизиса.

* Номер штамма совпадает с номером бактериоцина.

** Числа соответствуют лабораторным номерам штаммов.

*** Группа отражает максимальную и минимальную активность бактериоцинов.

мид или профагов и изучение частоты их встречаемости в бактериальных клетках и распределения по экологическим нишам открывает перспективу выяснения роли и значения автономных генетических элементов в экологии и физиологии практически значимой бактерии *E. carotovora*.

Исследование выполнено при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины, НДР Ф25/637-2007.

1. Сергеева Ж. Ю., Бурова Л. М., Товкач Ф. И. Внесение транспозона Tn9 в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Микробиол. журн. – 2006. – **68**, № 4. – С. 34–39.
2. Бурова Л. М., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Природа криптической плазмиды pCA25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A // Там само. – 2007. – **69**, № 2. – С. 23–28.
3. Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Типирование фитопатогенных штаммов *Erwinia carotovora* на основе пектолитической активности и чувствительности к бактериоцинам (каротоворицинам) // Микробиология. – 1997. – **66**, № 6. – С. 823–828.
4. Товкач Ф. И., Мукевич Н. С. Изучение бактериоцинов *Erwinia carotovora* с помощью бактериальных индикаторов, устойчивых к налидиксовой кислоте // Там же. – 2003. – **72**, № 2. – С. 199–205.
5. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – **145**, No 3. – P. 1365–1373.
6. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – **70**, № 6. – С. 804–810.

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

Поступило в редакцию 22.04.2008