УДК 578.26:579.842.1/.2

© 2009

**Л. В. Романюк, Н. С. Муквич, Ф. И. Товкач**

# Генерализованная трансдукция хромосомных маркеров *Erwinia carotovora* фагом ZF40

*(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Б. П. Мацелюхом)*

*Встановлено, що помірний ервініофаг ZF40 здатний здійснювати генералізовану трансдукцію хромосомних генів бактерії Erwinia carotovora. Показники частот трансдукції маркерів* $arg^+$, $met^+$, $ura^+$ *характеризуються широким діапазоном значень:* $7{,}0 \cdot 10^{-8}$–$1{,}1 \cdot 10^{-4}$. *Підвищення ефективності трансдукції вперше вдалося одержати на твердому середовищі LB. Такий підхід важливий для фагів подібних ZF40, у яких спостерігається процес реадсорбції фагових частинок. Перенесення бактеріальних генів за типом загальної трансдукції спряжене з циклічною пермутацією фагової ДНК. Одержані дані створюють передумови для молекулярно-генетичного вивчення процесу патогенезу у ервіній.*

В настоящее время установлено, что практически каждый известный вид бактерий является хозяином для одного или нескольких вирулентных или умеренных бактериофагов. Фаги являются универсальными инструментами для исследования молекулярно-генетической организации, генетического анализа и конструирования штаммов бактерий с помощью трансдукции. Трансдукция — один из ключевых процессов горизонтального переноса генов среди бактерий [1]. Бактериофаги способны преодолевать межвидовые генетические барьеры, переносить гены вирулентности, формировать патогенность у бактерий [2].

Явление трансдукции, как один из способов передачи генетической информации у микроорганизмов, широко распространено в природе. Этот процесс может осуществляться как умеренными, так и вирулентными бактериофагами, которые наравне с хромосомными генами способны передавать внехромосомные генетические элементы [3, 4]. Главным этапом при трансдукции является образование трансдуцирующих частиц, при этом основная роль отведена процессу упаковки ДНК. Особенности структуры генома бактериофагов, одной из которых является циклическая пермутация, играют основную роль в генерализованной трансдукции. При циклической перестановке нуклеотидов упаковка ДНК в вирусную частицу происходит по механизму заполнения головки. Регулятором в этом процессе служит сайтспецифическая нуклеаза, которая способна узнавать определенную нуклеотидную последовательность, называемую рас-сайтом [2, 5].

Ранее было установлено, что для фага ZF40 *Erwinia carotovora* характерна циклическая пермутация вирионной ДНК [6] и показана возможность переноса плазмиды pKM101 этим фагом [7]. Однако возможность переноса хромосомных генов фагом ZF40 до настоящего времени не установлена.

Цель проведенного нами исследования состояла в изучении генерализованной трансдукции хромосомных маркеров *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) фагом ZF40.

Для осуществления трансдукционного скрещивания фаг ZF40 размножали в клетках донорных штаммов. Реципиентами для последующего заражения служили ауксотрофные мутанты *E. carotovora*. Биохимические мутанты были получены под действием различных

мутагенных факторов. Мутанты, зависимые по урацилу — Ecc62A-d1/7, Ecc62A-d1/8, получены после действия 2-аминопуриннитрата [8]. Другие мутанты — Ecc62A-d1/50arg$^-$, Ecc62A-d1/ P5met$^-$, получены с помощью N-метил-N′-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ) [8]. Конечная концентрация НГ в мутагенизируемой смеси составляла 250 — 500 мкг/мл. Идентификацию осуществляли по Holliday [9]. В качестве трансдуцирующих фагов в работе применяли два clear-мутанта фага ZF40 — $c_6$ и 421. Такой выбор обусловлен существенными различиями между мутациями $c_6$ и 421. ZF40$c_6$ — точечный мутант, получен с помощью гидроксиламина, и в отличие от фага дикого типа он характеризуется меньшей степенью лизогенизации клеток чувствительных индикаторных штаммов [10]. Вирулентный мутант ZF40/421 имеет более существенные и значимые изменения в упаковке ДНК [11]. Трансдуцирующие лизаты фагов ZF40$c_6$ и ZF40/421 получали методом слитного лизиса на штаммах-донорах EccRC5297 и Ecc62A-d1 [7].

Эксперименты по переносу хромосомных генов 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 [10]. Трансдуцирующие лизаты ZF40/421 и ZF40$c_6$ по 5 мкл с титром $2{,}0 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл, а также их разведения $10^{-1}$, $10^{-2}$ и $10^{-3}$ наносили непосредственно на чашечные газоны индикаторных штаммов и инкубировали 18 ч при 28 °C. 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 ч при 28 °C. Суспензию клеток центрифугировали при 10000 об/мин, 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл жидкой минимальной среды и весь объем наносили на контрольные чашки с твердой минимальной средой, не содержащей ростового фактора. Отбор и учет трансдуктантов проводили через 72 ч. Частоту трансдукции выражали отношением числа трансдуктантов к числу бляшкообразующих частиц в 1 мл (БОЕ/мл) [12].

В результате проведенных экспериментов нам удалось осуществить перенос хромосомных маркеров arg$^+$, met$^+$, ura$^+$ обеими clear-мутантами фага ZF40 (табл. 1). Как показано ранее, для этих фагов характерна внутримолекулярная неоднородность, которая связана с пермутацией генома [7]. Бактериофаги с пермутированной ДНК способны осуществлять общую трансдукцию как плазмидных, так и бактериальных маркеров [2, 4]. Частота трансдукции плазмидных маркеров обычно ниже, чем хромосомных. Так, передача Ap$^r$-маркера плазмиды pKM101 фагом ZF40$c_6$ происходит с частотой $10^{-8}$, а перенос фагом ZF40/421

*Таблица 1.* Частота трансдукции хромосомных маркеров *Erwinia carotovora* фагом ZF40

| Трансдуцируемый маркер | Мутанты фага ZF40 | | | | Частота обратных мутаций |
|---|---|---|---|---|---|
| | $c_6^*$ | $c_6^{**}$ | 421–1*** | 421–2*** | |
| ura$^+$-1 | — | $7{,}0 \cdot 10^{-8}$ | $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ | — | $< 2{,}2 \cdot 10^{-9}$ |
| ura$^+$-2 | $1{,}3 \cdot 10^{-5}$ | — | — | — | $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ |
| arg$^+$ | — | — | — | $1{,}1 \cdot 10^{-5}$ | $1{,}9 \cdot 10^{-7}$ |
| met$^+$ | $1{,}25 \cdot 10^{-4}$ | $1{,}1 \cdot 10^{-4}$ | $6{,}3 \cdot 10^{-5}$ | $9{,}8 \cdot 10^{-5}$ | $1{,}4 \cdot 10^{-7}$ |

Примечание. "—" — не исследовали.
*Наработан на EccRC5297.
**Наработан на Ecc62A-d1.
***Представители двух популяционных наборов фага ZF40/421 [11].

вообще не зафиксирован [7]. Возможно, это обусловлено тем, что у фага ZF40/421 имеются существенные изменения в геноме, связанные с нарушением упаковки ДНК в прокапсид [11]. В отличие от этого, трансдукция хромосомных маркеров не только возможна, но и характеризуется высокими показателями частоты: от $1{,}4 \cdot 10^{-6}$ до $9{,}8 \cdot 10^{-5}$ для представителей двух популяционных наборов фага ZF40/421 (см. табл. 1) [11]. Частоты трансдукции биохимических маркеров ауксотрофных мутантов характеризуются широким диапазоном значений: $7{,}0 \cdot 10^{-8}$–$1{,}1 \cdot 10^{-4}$. В обоих случаях показатель частоты переноса хромосомных маркеров превышает таковой частоты обратных мутаций (см. табл. 1). Использование двух разных доноров EccRC5297 и Ecc62A-d1 для получения трансдуцирующих лизатов фага $ZF40c_6$ не показали различия в частоте трансдукции $met^+$-маркера. Показатель низкой частоты для маркера $ura^+$-1, очевидно, связан с особенностью мутации в данном локусе. Это подтверждается достаточно высоким значением частоты трансдукции для другого локуса $ura^+$-2 — оперона. То, что эти локусы отличаются, демонстрируют показатели частоты обратных мутаций: $< 2{,}2 \cdot 10^{-9}$ и $7{,}5 \cdot 10^{-8}$ для $ura^+$-1 и $ura^+$-2 соответственно (см. табл. 1).

Как уже отмечалось выше, природа генов, которые переносятся, может быть разной: это гены как хромосомного, так и нехромосомного происхождения. В нашем случае clear-мутанты фага ZF40 трансдуцировали arg, met, ura гены бактерии-хозяина. Ввиду своей способности переносить несколько хромосомных маркеров, а также внехромосомные маркеры плазмиды pKM101 [7] эти фаги отнесены нами к общетрансдуцирующим. Подобная ситуация справедлива для фагов Erch12 [13], EC2 *E. chrysanthemi* [14], 59 и 49 [12], $\phi$ KP *E. carotovora* [15], у которых перенос arg, met, ura генов наблюдался с частотой $2{,}0 \cdot 10^{-8}$–$9{,}0 \cdot 10^{-6}$. При трансдукции этих же маркеров на твердой среде LB нами получены показатели частоты значительно выше — от $7{,}0 \cdot 10^{-8}$ до $1{,}25 \cdot 10^{-4}$. Преимущество такого подхода очевидно: существенно поднимаются показатели частоты трансдукции. Вообще, его применение важно для фагов подобных ZF40, у которых наблюдается процесс реадсорбции фаговых частиц.

Таким образом, нам впервые удалось показать способность осуществления общей трансдукции хромосомных генов умеренным эрвиниофагом ZF40, что создает предпосылки для молекулярно-генетического изучения процессов патогенеза с участием практически значимой бактерии *E. carotovora* и ее автономных генетических элементов.


1. *Горб Т. Е., Товкач Ф. И.* Метод исследования горизонтального переноса плазмид у *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2002. – **64**, № 3. – С. 20–26.
2. *Mann B. A., Slauch J. M.* Transduction of low-copy number plasmids by bacteriophage P22 // Genetics. – 1997. – **146**. – P. 447–456.
3. *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**, No 3. – P. 1091–1104.
4. *Hertwig S., Popp A., Freytag B. et al.* Generalized transduction of small Yersinia enterocolitica plasmids // Appl. and Environ. Microbiol. – 1999. – **65**, No 9. – P. 3862–3866.
5. *Jobocka M. B., Rose D. J., Plunkett G. et al.* Genome of bacteriophage P1 // J. Bacteriol. – 2004. – **186**, No 21. – P. 7032–7068.
6. *Панщина Ф. И., Товкач Ф. И.* Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2006. – **68**, № 6. – С. 42–47.
7. *Панщина Ф. И., Товкач Ф. И.* Генерализованная трансдукция плазмиды pKM101 умеренным бактериофагом ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 6. – С. 43–47.
8. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. – Москва: Мир, 1976. – 436 с.
9. *Клаус Р., Хейс У.* Сборник методик по генетике микроорганизмов. – Москва: Медицина, 1970. – 248 с.
10. *Кушкина А. И., Товкач Ф. И.* Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 // Мікробіол. журн. – 2005. – **67**, № 3. – С. 50–60.

11. *Ivanytsya T. V., Kushkina A. I., Tovkach F. I.* Mechanism of formation of defective phage particles of *Erwinia carotovora* // Abstr. Intern. conf. "Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting., Tbilisi, June 12–15, 2008. – Tbilisi, Georgia. – P. 42.
12. *Муквич Н. С., Романюк Л. В., Кишко Я. Г.* Генетический перенос хромосомальных маркеров *Erwinia horticola* 450 умеренными фагами 49 и 59 // Микробиол. журн. – 1987. – **49**, № 4. – С. 31–35.
13. *Chatterjee A. K., Brown M. A.* Generalized transduction in the enterobacterial phytopathogen *Erwinia chrysanthemi* // J. Bacteriol. – 1980. – **143**, No 3. – P. 261–268.
14. *Resibois A., Colet M., Faelen et al.* OEC2, new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi* // Virology. – 1984. – **137**, No 1. – P. 102–112.
15. *Toth I., Perombelon M., Salmond G.* Bacteriophage OKP mediated generalized transduction in *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – **139**, No 4. – P. 2705–2709.

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

*Поступило в редакцию 06.10.2008*

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

## The generalized transduction of chromosomal markers *Erwinia carotovora* by phage ZF40

*For the first time, it is shown that the temperate erwiniaphage ZF40 is capable to mediate the generalized transduction of chromosomal genes of bacterium Erwinia carotovora. The values of frequencies transduction markers* $\mathrm{arg}^+$, $\mathrm{met}^+$, $\mathrm{ura}^+$ *are variable from* $7.0 \cdot 10^{-8}$ *to* $1.1 \cdot 10^{-4}$. *The increase of the transduction efficiency is firstly obtained on solid medium LB. This method has the great importance for phage ZF40 because such phages are characterized by the readsorption of phage particles. The transmission of bacterial genes due to the generalized transduction links with the permutation of phage DNA. The obtained data are the important prerequisite for the molecular and genetical study of pathogenesis processes in erwinias.*