

## СТІЙКІСТЬ ДО ТЕТРАЦИКЛІНУ *Escherichia coli*, ЩО НЕСЕ ПЛАЗМІДИ З ВАРІАНТАМИ ГЕНА *tet<sup>r</sup>*

**О. Ю. Смірнов**, канд. біол. наук, ст. наук. співробітник  
Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми

*Исследована экспрессия гена тетрациклин-резистентности в плаزمидах pBR322, pBRH4, pEC3501 и pEC3503 после трансформации ими бактерии Escherichia coli. Показано, что уровень стойкости бактерии к тетрациклину разный у разных штаммов E. coli и зависит от питательной среды.*

*Ключевые слова: плазмиды, тетрациклин-резистентность, штаммы E. coli.*

*Досліджена експресія гена тетрациклин-резистентності у плазмідах pBR322, pBRH4, pEC3501 і pEC3503 після трансформації ними бактерії Escherichia coli. Показано, що рівень стійкості бактерії до тетрацикліну є різним у різних штамів E. coli та залежить від живильного середовища.*

*Ключові слова: плазміди, тетрациклин-резистентність, штами E. coli.*

### ВСТУП

Одним з методів вивчення фрагментів ДНК, що мають промоторну активність, є такий: у плазміді, що несе ген стійкості до антибіотика, видаляють промотор цього гена й замінюють його на фрагмент, що містить сайт упізнання рестриктази. Якщо в цей сайт клонують фрагмент ДНК, що несе промотор, відбувається активація гена [1].

Тетрациклін, що утворюється актиноміцетами роду *Streptomyces* (*S. aureofaciens* і *S. rimosus*), та його похідні є протибактеріальними бактеріостатичними антибіотиками широкого спектру дії [2- 4]. Вони пригнічують синтез білка, з'єднуючись з 30S-субодиницею рибосом бактерій і перешкоджаючи зв'язуванню аміноацил-тРНК з рибосомою [3, 5, 6], але деякі аналоги тетрацикліну мають інший механізм дії [7]. Стійкість бактерій до тетрациклінів може бути зумовлена різними факторами, і важливу роль тут відіграють гени, що містяться в плазмідах і транспозонах, причому більше 60 таких генів уже секвеновані [8]. Ген *tet<sup>r</sup>*, що міститься в плазміді pBR322 [9], належить до класу С і зумовлює активне виведення антибіотика з клітини [8, 10, 11, 12].

Оскільки в деяких дослідях була доведена пряма залежність стійкості бактерій до тетрацикліну від дози гена [12], ген *tet<sup>r</sup>* із плазміди pBR322 може бути використаний для вивчення промоторної активності клонуваних фрагментів ДНК, для отримання мутацій, що підсилюють експресію даного гена, а також для вивчення процесу формування стійкості бактерій до тетрацикліну.

### МЕТА РОБОТИ

Дослідити експресію гена *tet<sup>r</sup>* під контролем різних нуклеотидних послідовностей у різних штаммах *E. coli* й вивчити умови отримання мутацій, що підсилюють активність даного гена.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Штами *Escherichia coli*: C600 (F<sup>-</sup> *thr leu thi r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>*) і 65-54 (F<sup>-</sup> *thr leu metB lac gal su2 str<sup>r</sup> recA*).

Плазміди: pBR322 з геном *tet<sup>r</sup>*, pBRH4 (похідна від pBR322, у якій видалений фрагмент промотору гена *tet<sup>r</sup>* [13]), pBRH4Δ22 (похідна від

pBR322, у якій делеція в 22 нуклеотидних пари різко знижує ефективність промотору гена *tet<sup>r</sup>*, отримана С. А. Чувпило, ІМГ РАН), pEC3501 і pEC3503 (отримані І. О. Басс, О. В. Куреновою та С. Л. Мехедовим, ІМГ РАН, шляхом клонування *EcoRI*-фрагментів хромосоми *E.coli* з ділянки 88-ї хвилини). Плазміда pBRH4Δ22 була люб'язно надана С. А. Чувпило, інші плазміди й штами – І. О. Басс.

Виділення плазмідної ДНК проводили лужним методом [14]: у колбу з 100 мл бульйону Хоттінгера додавали 0,5 мл нічної культури *E. coli*, підрощували до оптичної щільності  $D_{550}=0,8$ , додавали 1 мл спиртового розчину хлорамфеніколу концентрації 17 мг/мл і ростили на качалці 18 год при 37°C. Клітини осаджували на холоді (3000 об/хв), промивали холодним TES-буфером (50 mM NaCl, 50 mM трис-HCl pH 8, 5 mM ЕДТА), осад суспендували в 5 мл розчину А (25 mM трис-HCl pH 8, 20 mM ЕДТА, 50 mM глюкоза, 1 мг/мл лізоцим), витримували 20 хв. при 0°C, додавали 10 мл розчину Б (0,2 M NaOH, 1% SDS), обережно розмішували 5 хв., додавали 7,5 мл 3 M ацетату натрію pH 4,8, розмішували й витримували 1 год при 0°C. Осаджували на холоді, до надосадової рідини додавали 45 мл холодного етанолу, витримували 2 год при 0°C, осаджували, осад суспендували в 2 мл розчину В (50 mM трис, 100 mM ацетату натрію, pH 6), осаджували, до надосадової рідини додавали 5 мл етанолу, витримували 2 год при 0°C, осаджували, осад розчиняли в 100 мкл TES-буфера.

Отримання кальцієвих клітин: до 80 мл бульйону Хоттінгера додавали 0,5 мл нічної культури *E. coli*, підрощували до оптичної щільності 0,5, осаджували на холоді, суспендували в 40 мл холодного (0°C) 0,05 M розчину CaCl<sub>2</sub>, витримували в льоді 10 хв., осаджували й ресуспендували осад у 2 мл 0,05 M CaCl<sub>2</sub>, зберігали в холодильнику 6–8 днів.

Трансформація: до 10 мкл розчину ДНК додавали 0,1 мл Ca-клітин і витримували 1 год при 0°C, переносили в термостат на 10 хв. при 37°C (тепловий шок) і в лід на 5 хв., додавали 2,5 мл бульйону Хоттінгера, підрощували 2,5 год при 37°C на качалці. По 0,1 мл трансформаційної суміші висівали на чашки Петрі з антибіотиком, розтирали шпателем і після інкубації підраховували кількість колоній або висівали трансформаційну суміш краплями по 10 мкл і після інкубації відмічали наявність або відсутність росту колоній.

Живильне середовище: бульйон Хоттінгера; Хоттінгер-агар (ХА) (бульйон Хоттінгера + 2% агару); агар LB (LBA) (10 г/л пептон, 5 г/л дріжджовий екстракт, 10 г/л NaCl, 2% агару); пептоно-сольовий агар (ПСА) (10 г/л пептон, 10 г/л NaCl, треонін, лейцин і тіамін – 5 мкг/мл, 2% агару). Тетрацикліну гідрохлорид (розчин у 50% етанолі, 50 мг/мл) додавали до концентрації від 2 до 100 мкг/мл, ампіцилін (розчин у воді 250 мг/мл) додавали до концентрації 200 мкг/мл.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За літературними джерелами, використовується декілька показників рівня стійкості клітин до Tc: 1) максимальна концентрація Tc, що дозволяє колоніям утворюватися [15]; 2) концентрація Tc, що пригнічує ріст бактерій на чашках на 50% [16]; 3) мінімальна концентрація Tc, що повністю пригнічує ріст бактерій [17].

Рівень експресії гена *tet<sup>r</sup>* у даній роботі оцінювали за кількістю колоній, що виживали, за максимальною концентрацією Tc, що дозволяє колоніям утворюватися, та за мінімальною концентрацією Tc, при якій був відсутній ріст колоній-трансформантів протягом 20–36 год інкубації при 37°C.

Вивчення експресії гена *tet<sup>r</sup>* у плазмідах pBR322, pBRH4, pEC3501 і pEC3503 проводили після трансформації ними штамів *E. coli* С600 і 65-54. Трансформаційну суміш висівали на агаризоване середовище, що містило 200 мкг/мл ампіциліну (контроль трансформації, ефективність

якої становила звичайно близько 1–5 тисяч колоній на чашку), і на середовище з діапазоном концентрації тетрацикліну (Тс) від 2 до 100 мкг/мл. Суміш або рівномірно розподіляли по чашці шпателем, або висівали краплями.

Була встановлена різниця в експресії гена *tet<sup>r</sup>* залежно від виду плазміди, штаму *E. coli* та живильного середовища (табл. 1).

Таблиця 1 – Стійкість до тетрацикліну штамів *E. coli* (процент виживаності колоній), трансформованих різними плазмідами, залежно від середовища

Плазміда	Штам/ середови- ще	Концентрація тетрацикліну в агарі, мкг/мл										
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
pBR322	C600/ LBA	100	100	100	100	100	100	42- 58	24- 27	14- 19	8- 12	6-7
	C600/ XA	100	100	100	12	0,5	0	0	0	0	0	0
	65-54/ LBA	100	100	100	65	15	0,7	0	0	0	0	0
	65-54/ XA	100	41	11	0,5	0	0	0	0	0	0	0
pBRH4	C600/ LBA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pEC3501	C600/ LBA	100	100	100	100	100	100	58	11	0- 0,6	0	0
	C600/ XA	100	80	17	0	0	0	0	0	0	0	0
	65-54/ LBA	100	100	100	42	0,8	0	0	0	0	0	0
	65-54/ XA	100	100	37	0	0	0	0	0	0	0	0
pEC3503	C600/ LBA	100	100	80	33	0,2- 8	0	0	0	0	0	0
	C600/ XA	100	27	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0
	C600/ ПСА	100	100	100	72	0	0	0	0	0	0	0
	65-54/ LBA	100	100	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0
	65-54/ XA	100	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0

Дані стосовно максимальних концентрацій Тс, при яких виживає 100% колоній, і мінімальних концентрацій, що повністю пригнічують ріст (табл. 1 і рис.1), показують, що природний промотор гена *tet<sup>r</sup>* у

плазміді pBR322 є найсильнішим, у плазміді pEC3501 трохи слабший, у плазміді pEC3503 ще слабший, а в плазміді pBRH4 ген зовсім не функціонує, оскільки промотор відсутній. Різниця в активності гена *tet<sup>r</sup>* із різних плазмід зберігається в різних штаммах *E. coli*, що вирощуються на певному агарі. Відомо, що ступінь стійкості до Тс звичайно пропорційний ефективності промотору [1, 18], але, як видно з рис. 1 і табл. 1, залежність числа колоній, що виживають, від концентрації Тс в середовищі не є прямо пропорційною, що узгоджується з літературними даними [19]. Ефективність дії плазмідного гена *tet<sup>r</sup>* можна також оцінювати після висіву трансформаційних сумішей краплями на чашки з різною концентрацією Тс і відзначення наявності ("+") або відсутності ("-") росту колоній: штам С600 з плазмідною pBRH4 не ріс на чашках уже з 5 мкг/мл Тс, а з плазмідною pBR322 ріст спостерігався на чашках із 150 мкг/мл Тс, але був відсутній при 200 мкг/мл Тс (табл. 2). Подібні результати були отримані й при висіві краплями по 10 мкл нічних культур трансформованих бактерій у розведенні 1:10<sup>3</sup>. Ці дані свідчать про те, що ефективність роботи гена *tet<sup>r</sup>* можна оцінювати як за кількістю колоній на агарі з Тс, так і за мінімальною концентрацією Тс, що повністю пригнічує ріст колоній при висіві трансформаційної суміші на чашку краплями.

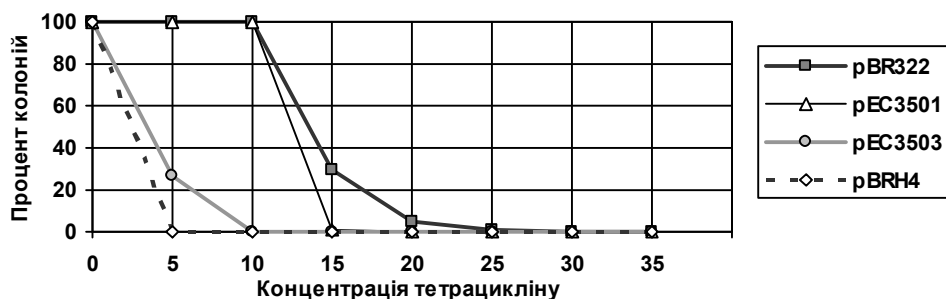


Рисунок 1 – Стійкість до тетрацикліну бактерій штаму 65-54 на агарі Хоттінгера залежно від типу плазміди

Примітка. За 100% прийнята кількість колоній, що вирости на чашках з ампіциліном без тетрацикліну (контроль)

Таблиця 2 – Стійкість до тетрацикліну штаму *E. coli* С600, трансформованого плазмідами pBRH4 і pBR322

Плазміда	Концентрація тетрацикліну в агарі, мкг/мл									
	0 (200 мкг/мл ампіцилін)	5	10	20	30	50	80	120	150	200
pBRH4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pBRH4Δ22	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pBR322	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Як видно з табл. 1, штам С600 забезпечує значно більший ступінь стійкості бактерій до Тс, ніж штам 65-54. Наприклад, для плазміди рЕС3501 на середовищі LVA мінімальна концентрація Тс, що повністю пригнічує ріст колоній, дорівнює 90 мкг/мл для штаму С600 і 50 мкг/мл для штаму 65-54.

На агарах LVA і ПСА стійкість бактерій до Тс була вищою, ніж на більш багатому за складом агарі Хоттінгера. Причини цього залишаються незрозумілими. Існують дані про те, що неочищений агар зв'язує тетрациклін, знижуючи його ефективну концентрацію [1], але в наших експериментах агар-агар, що додавався до рідкого середовища до концентрації 2%, був тим самим.

Під час більш тривалої інкубації чашок Петрі (36–48 годин замість 18–24 годин) стійкість бактерій до Тс підвищувалася, наприклад, для штаму С600 з плазмідною рЕС3501 на LVA мінімальна концентрація Тс, що повністю пригнічувала ріст, підвищувалася з 80 до 100 мкг/мл. У дослідженні були встановлені певні коливання стійкості до Тс одного й того самого штаму *E. coli*, трансформованого тією ж плазмідною в різних серіях експериментів на тому ж середовищі, що може бути викликано різницею в тривалості інкубації, залежати від партії середовища або інших причин.

Умови, які підібрані для вирощування клітин-трансформантів, дозволяють отримувати спонтанні та індуквані мутації, що підсилюють експресію *tet*-гена.

Автор висловлює глибоку подяку співробітникам ІМГ РАН за надану можливість виконати цю роботу.

## ВИСНОВКИ

Показано, що залежність процента виживаності бактерій *E. coli*, які несуть плазміди з різними варіантами гена *tet<sup>r</sup>*, від концентрації тетрацикліну є нелінійною, але дозволяє оцінити рівень експресії цього гена за ступенем пригнічення росту колоній на агарі з різною концентрацією антибіотика. Установлено, що умови культивування (вид агаризованого середовища, тривалість інкубації), а також різновид штаму бактерій впливають на рівень стійкості клітин до антибіотика.

Підібрані умови для отримання плазмідних мутацій, що підсилюють активність плазмідного гена *tet<sup>r</sup>*.

Перспективи подальших досліджень: отримати мутації, що підвищують активність гена *tet<sup>r</sup>*, визначити нуклеотидну послідовність мутантних промоторів цього гена, а також дослідити механізм впливу живильного середовища на стійкість бактерій до тетрацикліну.

## SUMMARY

### RESISTANCE OF *Escherichia coli*, CARRYING PLASMIDS WITH VARIANTS OF THE *tet<sup>r</sup>* GENE, TO TETRACYCLINE

**O.Yu. Smirnov**

*Medical Institute of Sumy State University, Rymshki-Korsakov Str., 2, Sumy, Ukraine, 40007*

*Expression of the tetracycline resistant gene in plasmids pBR322, pBRH4, pEC3501, and pEC3503 after transformation of Escherichia coli was investigated. Level of bacterial resistance to tetracycline was shown to be different in different E. coli strains and depends on culture medium.*

*Key words: tetracycline resistant gene, Escherichia coli, plasmids.*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. An G. Plasmid vehicles for direct cloning of *Escherichia coli* promoters / G. An, J.D. Friesen // J. Bacteriol. – 1979. – Vol. 140, No 2. – P. 400–407.
2. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках : Учебник. – 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.

3. Chopra I. Mechanisms of resistance to antibiotics and other chemotherapeutic agents / I. Chopra // *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* – 1988. – P. 149S–166S.
4. Chopra I. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance / I. Chopra, M. Roberts // *Microbiology and Mol. Biol. Rev.* – 2001. – Vol. 65, No 2. – P. 232–260.
5. Медицинская микробиология / Гл. ред. В. И. Покровский, О. К. Поздеев. – М. : ГЭОТАР; Медицина, 1999. – 1184 с.
6. Speer B. S. Bacterial resistance to tetracyclines: Mechanisms, transfer, and clinical significance / B. S. Speer, N. B. Shoemaker, A. A. Salyers // *Clin. Microb. Rev.* – 1992. – Vol. 5, No 4. – P. 387–399.
7. Chopra I. Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome / I. Chopra // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – Vol. 38. – No 4. – P. 637–640.
8. Collard J.-M. Tetracycline resistance / J.-M. Gollard // Belgian Biosafety Server – Antibioresistance Archive, 1998. – [www.antibioresistance.be/Tetracycline/Menu\\_Tet.html](http://www.antibioresistance.be/Tetracycline/Menu_Tet.html). – Last check 25.05.2009.
9. Sutcliffe J.G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322 / J.G. Sutcliffe // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1979. – Vol. 43. – P. 77–90.
10. Collard J.-M. Tetracycline resistance gene classification: Class C / J.-M. Gollard // Belgian Biosafety Server – Antibioresistance Archive, 1998. – [www.antibioresistance.be/Tetracycline/Tetdescription/default.html](http://www.antibioresistance.be/Tetracycline/Tetdescription/default.html). – Last check 25.05.2009.
11. Yamaguchi A. Bacterial resistance mechanisms for tetracyclines / A. Yamaguchi // *Nippon Rinsho.* – 1997. – Vol. 55, No 5. – P. 1245–1251.
12. Chopra J. Bacterial resistance to the tetracyclines / J. Chopra, T. G. B. Howe // *Microbiol. Rev.* – 1978. – Vol. 42, No 4. – P. 707–724.
13. Rodriguez R. L. Characterizing wild-type and mutant promoters of the tetracycline resistance gene in pBR313 / R. L. Rodriguez, R. W. West, H. L. Heyneker, F. Bolivar, H. W. Boyer // *Nucl. Acids Res.* – 1979. – Vol. 6, No10. – P. 3267–3287.
14. Birnboim H. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA / H. C. Birnboim, J. Doly // *Nucl. Acids Res.* – 1979. – Vol. 7, No 4. – P. 1513–1523.
15. An G. Characterization of promoter-cloning plasmids: Analysis of operon structure in the rif-region of *Escherichia coli* and isolation of an enhanced internal promoter mutant / G. An, J. D. Friesen // *J. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 144, No 3. – P. 904–916.
16. Tait R. C. Altered tetracycline resistance in pSC101 recombinant plasmids / R. C. Tait, R. L. Rodrigues, H. D. Boyer // *Mol. Gen. Genet.* – 1977. – Vol. 151, No 3. – P. 327–331.
17. Bastin M. Molecular cloning in plasmid pBR322 giving altered expression of the tetracycline resistance gene / M. Bastin // *J. Gen. Microb.* – 1981. – Vol. 123. – P. 187–191.
18. Widera G. The expression of tetracycline resistance after insertion of foreign DNA fragments between the *EcoRI* and *HindIII* sites of the plasmid cloning vector pBR322 / G. Widera, F. Gautier, W. Lindenmaier, J. Collins // *Mol. Gen. Genet.* – 1978. – Vol. 163, No. 3. – P. 301–305.
19. Stefano J. E. Alterations in two conserved regions of promoter sequence lead to altered rates of polymerase binding and level of gene expression / J. E. Stefano, J. W. Ackerson, J. D. Gralla // *Nucl. Acids Res.* – 1980. – Vol. 8, No 12. – P. 2709–2723.

*Надійшла до редакції 29 травня 2009 р.*