

ДОСЛІДЖЕННЯ ПЛАЗМІДНИХ ДНК ТРЬОХ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI*

Наявність плазмідних ДНК досліджувалася у трьох клінічних штамів Escherichia coli. Штами 345 та 1257 містили по одній плазміді – pEC345 (5,1 тпн) та pEC1257 (5,0 тпн). Штам 951 містив 3 плазмиди pEC951-1 (50 тпн), pEC591-2 (7,2 тпн) і pEC591-3 (1,7 тпн). За допомогою рестрикційного аналізу виявлено різну первинну будову плазмід pEC345 і pEC1257.

Вступ

Як відомо, внутрішньолікарняні інфекції (ВЛІ) стали однією з найбільш гострих проблем сучасної системи охорони здоров'я як в Україні, так і у всьому світі. Встановлено, що спалахи ВЛІ нині найчастіше спричиняють умовно-патогенні мікроорганізми. Збудниками до 50 % випадків ВЛІ є бактерії родини Enterobacteriaceae: штами *Escherichia coli*, деякі види родів *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* та низка інших.

Встановлено, що плазмиди дуже поширені серед представників ентеробактерій [1]. Позахромосомна ДНК виявлена у 25–75 % всіх досліджених штамів цієї родини залежно від місця відбору зразка та родових особливостей бактерій [1]. Наявність плазмід у патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів має особливо велике значення через детермінацію ними стійкості до антибіотиків чи синтезу токсинів та можливість передачі цих властивостей патогенним мікроорганізмам.

У трьох клінічних штамів *Escherichia coli* було виявлено плазмідні ДНК. Метою нашого дослідження було визначення їх молекулярного розміру та рестрикційний аналіз.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами *Escherichia coli* 345, 951 та 1257 з музею культур Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Громашевського АМН України.

У дослідках використовували середовища МПБ та МПА.

Плазмідну ДНК з клітин *Escherichia coli* отримували за методом, Кізера [2]. Рестрикційний аналіз плазмідних ДНК проводили за Маніатісом [3]. Використовували рестриктази і ДНК фага λ фірми «Ферментас» [4]. Електрофорез проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ буфері [3]. Як стандарт молекулярних розмірів фрагментів плазмідної ДНК використовували HindIII– та HindIII+ EcoRI– фрагменти ДНК фага λ [3, 4].

Результати та їх обговорення

Як вже зазначалося, три штами *Escherichia coli*, які використовувалися в дослідженнях, було виділено при спалахах ВЛІ в різних лікарнях міста Києва. Наші дослідження виявили наявність плазмідних ДНК у всіх трьох штамів. Два штами *E. coli* (345 та 1257) містили по одній плазміді, а третій (951) був багатоплазмідним.

У клітинах штаму *E. coli* 591 виявлено 3 плазмідних ДНК pEC591-1 (50 тпн), pEC591-2 (9,2 тпн) та pEC591-3 (1,7 тпн). За даними наукової літератури, одночасне існування в клітині кількох плазмід є досить розповсюдженим явищем. Випадки мультиплазмідних штамів виявлені щодо представників різних родів (*Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptomyces* та багатьох інших) [1, 5, 6]. Так встановлено, що штам *E. coli* E24377A містить 6 плазмід з молекулярними розмірами 5,0 тпн, 6,2 тпн, 34,4 тпн, 70,1 тпн, 74,2 тпн та 79,2 тпн [7].

Значний інтерес становить найменша плазмід-да pEC591-3, котра може слугувати основою для побудови векторних молекул. У багатьох мікроорганізмів виявлено плазмиди, молекулярний розмір яких менше 2000 пн. Так, у представників родини Enterobacteriaceae виявлено кілька малих плазмід: 3 плазмиди *E. coli* pO26-S1 (1549 пн), pKL1 (1549 пн) та pMG828-1 (1902 пн), плазмід *Erwinia amylovora* pEA1,7 (1711 пн) і плазмід *Salmonella enteritidis* pB (1983 пн) [5, 7, 8]. У представників інших родин також встановлено наявність малих плазмід, наприклад, плазмід *AP12875* (1440 пн) у *Acetobacter pasteurianus*, плазмід *pCR1* (1488 пн) у *Corynebacterium renale*, плазмід *Ta144 DW* (1313 пн) у *Moraxella* sp., плазмід *pBG7AU* (1022 пн) у *Mycoplasma* sp., плазмід *RKU-1* (846 пн) у *Thermotoga petrophila* тощо [9, 10, 11]. У плазмід з молекулярним розміром 2,0 тпн і менше виявлено детермінанти для одного чи декількох білків: так, плазмід *AP12875* детермінує 2 протеїни, а плазмід *pEA1,7* 5 білків. Функції цих

білків, як повідомляється, здебільшого забезпечують реплікацію плазмиди та рівнозначний розподіл копій при поділі клітини-господаря [7].

Раніше нами повідомлялося про виявлення плазмиди pEC1257 у штаму *Escherichia coli* 1257 [12, 13]. За допомогою рестрикційного аналізу було встановлено, що на плазміді pEC1257 є унікальні сайти рестрикції для 5 рестриктаз (Bsp120I, SalGI, Eco47I, BamHI та BglII), 2 сайти рестрикції для ферменту Bsp119I у жодного для 4 рестриктаз (PstI, EcoRI, XbaI та HindIII), визначено також її молекулярний розмір у 5,0 тпн. При гідролізі плазмиди pEC1257 ендонуклеазою Bsp119I утворюються 2 фрагменти (2,0 тпн та 3,0 тпн) [12].

За допомогою лужно-фенольного методу Кізера у штаму *E. coli* 345 було виявлено плазмідну ДНК, яка отримала назву pEC345. Дослідження фізичної будови виявленої колійної плазмиди pEC345 проводили з використанням 6 ендонуклеаз рестрикції II типу: PstI, Bsp119I, EcoRI, HindIII, BamHI та BglII. За даними рестрикційного аналізу плазмідної ДНК встановлено, що плазмідна має унікальні сайти рестрикції для 5 рестриктаз (Bsp119I, EcoRI, HindIII, BamHI та BglII) та 2 сайти рестрикції для ферменту PstI. При гідролізі плазмиди pEC345 ендонуклеазою рестрикції PstI утворюються 2 фрагменти (2,5 тпн та 2,65 тпн).

Відомо, що однакова електрофоретична рухливість плазмід не означає тотожність їх первинної будови: так, плазмиди pAlvA (*Hafnia alvei*) та pBS512_5 (*Shigella boydii* CDC 3083–94) мають молекулярний розмір 5113 пн, але рестрикційний аналіз плазмідних ДНК виявив відмінності в їх нуклеотидних послідовностях [7, 14]. Аналогічні висновки щодо нетотожності 2 колійних плазмід pKL1 та pO26–S1 з молекулярним розміром 1549 пн зроблено при дослідженні їх нуклеотидних послідовностей, які представлені в Інтернет-базі даних [5, 7].

Порівняння даних рестрикційного аналізу плазмідних ДНК 2 штамів кишкової палички, представлених у таблиці 1 та на рисунку 1 дозволяють дійти висновку, що штами *Escherichia coli* 1257 та 345 містять плазмиди pEC1257 та pEC345, що відрізняються нуклеотидною послідовністю молекул.

На початку 2009 року в Інтернет-базі даних GenBank було представлено нуклеотидні послідовності 7 плазмід з молекулярним розміром 5,0–5,1 тпн мікроорганізмів з родини Enterobacteriaceae: pECO1 (*Enterobacter cloacae* IFO 3320), pIGJC156, pIGRWZ12, pETEC_5 (*E. coli*), pAlvA (*Hafnia alvei*), pBS512_5 (*Shigella boydii* CDC 3083–94), pSS046_spB (*Shigella sonnei* 046_spB) [7, 14, 15, 16].

Порівняльний аналіз інформації з Інтернет-баз даних про кількість сайтів рестрикції та розташування їх на цих 7 плазмідах та результатів, отриманих нами для плазмід pEC1257 і pEC345 дозволив зробити висновок про нетотожність

фізичних карт виявлених нами плазмід *E. coli* з такими, що представлені в базах даних [7].

Таблиця 1. Рестрикційний аналіз плазмід pEC345 та pEC1257

Ендонуклеази II типу	Кількість сайтів рестрикції на плазміді pEC345	Кількість сайтів рестрикції на плазміді pEC1257 [11]
Bsp119I	1	2 (2,0; 3,0 тпн)
EcoRI	1	0
BamHI	1	1
BglII	1	1
PstI	2 (2,5; 2,65 тпн)	0
HindIII	1	0
Середній молекулярний розмір плазмід	5,1 тпн	5,0 тпн

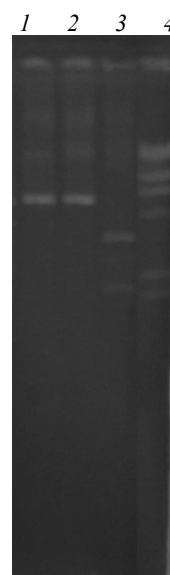


Рис. 1. Електрофореграма Bsp119I–рестриктів плазмідних ДНК штамів *Escherichia coli*: 1 – pEC345+ BglII; 2 – pEC345+ Bsp119I; 3 – pEC1257+ Bsp119I; 4 – λ+HindIII+ EcoRI

Необхідно відмітити, що плазмиди такого молекулярного розміру також дуже поширені й у мікроорганізмів інших родів родини Enterobacteriaceae [7]. Прикладами можуть слугувати плазмиди DN1 (*Dichelobacter nodosus*), pYAN–1 і pYAN–2 (*Sphingobium yanoikuyae*), pS4C (*Thermus* sp. 4C), pAC5 (*Acetobacter aceti*), pAM5 (*Acidiphilium multivorum*), pE33L5 (*Bacillus cereus* E33L) та багато інших.

На плазмідах молекулярного розміру 4,9–5,1 тпн виявлено гени для низки додаткових білків, в той час як на найменших плазмідах (наприклад, pKL1 чи pO26_S1) 1,5 тпн, які практично є мінірепліконами, містяться гени тільки для гербілків [7]. Так, в склад перших входять кластери генів, що детермінують синтез бактеріоцинів та стійкість до них (наприклад, альвеїцину плазмідною pAlvA та соліцину плазмідною pSS046_spB) [14]. Також встановлено плазмідну локалізацію генів,

продукти яких забезпечують міжклітинне перенесення самої плазмиди (mob-гени плазмід pIGRWZ12, pSS046_spB, pECO1) чи транспорт речовин (плазмиди pIGRW12 містить ген PtxR, який кодує регулятор транспорту фосфатів) [7, 16].

Встановлюються властивості, які детермінуються плазмідами pEC345 та pEC1257. Проведено сіквенування 2 фрагментів ДНК плазмиди pEC1257, розміри визначених нуклеотидних послідовностей становлять 654 пн та 515 пн. Значну гомологію нуклеотидної будови (до 91 %) виявлено у першому фрагменті плазмиди pEC1257 в 160 пн з послідовностями відрізка ДНК ряду плазмід *Escherichia coli*: pColE1-H22 (5,1 тпн), pCol-let (5,8 тпн), pColK-K235 (3,8 тпн), pMH11 (6,5 тпн) та ряду інших. [13].

Однак за результатами сіквенс-аналізу однозначно визначити функцію даного фрагмента плазмиди pEC1257 неможливо. Нами виявлено гомологію до нуклеотидних послідовностей фрагментів ДНК низки інших плазмід та хромосом мікроорганізмів; для генів, які входять в їх склад, визначено детермінацію ензимів з різними функціями (стійкість до антибіотиків, рестриктазна активність, ферментація вуглеводів, протеїнів тощо).

У зв'язку з тим, що послідовності ДНК з такою нуклеотидною будовою досить поширені серед мікроорганізмів різних родів та виявлені в складі як плазмідних, так і хромосомних ДНК, ми вважаємо, що цей фрагмент є консервативним за своєю первинною будовою [13].

Планується продовжити дослідження фізіологічних та біохімічних властивостей штамів *Escherichia coli* 345 і 1257 та визначити, які з них мають плазмідну детермінацію.

Таким чином, у всіх трьох штамів *Escherichia coli*, довільно вибраних з великої колекції клінічних культур, виявлено наявність позахромосомних ДНК. Один з них (штам 951) містив не менше трьох плазмід різного молекулярного розміру, в той час як два інших містять по одній плазмиді. Проведені рестрикційний аналіз останніх та порівняльне дослідження отриманих результатів з інформацією Інтернет-баз даних. Встановлено, що плазмиди pEC345 та pEC1257 мають фізичні карти відмінні від таких плазмід, представлених Інтернет-базами даних. Виявлено гомологію нуклеотидної послідовності плазмиди pEC1257 з нуклеотидними послідовностями кластерів Col-генів ряду плазмід *Escherichia coli*.

1. Su L. H. An epidemic of plasmid? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* / L. H. Su, C. Chu, A. Cloeckert, C. H. Chiu // *FEMS Immunol Med Microbiol.* – 2008. – Vol.52, № 2. – P. 155–166.
2. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* / T. Kieser // *Plasmid.* – 1984, №12. – P.19–36.
3. Маниатис Т. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбук. – М.: Мир. – 1984. – 450 с.
4. Каталог фірми MBI. Fermentas. – 2006–2007.
5. Burian J. Small cryptic plasmids of multiplasmid clinical *Escherichia coli* / J. Burian, L. Guller, M. Macor, W. W. Kay // *Plasmid.* – 1997. – Vol. 37, № 1. – P. 2–14.
6. Yang F. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery / F. Yang, J. Yang, X. Zhang et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33, № 19. – P. 6445–6458.
7. Інтернет-база даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)
8. Gregorova D. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* harbours ColE1, ColE2, and rolling-circle-like replicating plasmids / D. Gregorova, J. Matiasovicova, A. Sebkova, M. Faldynova, I. Rychlik // *Can. J. Microbiol.* – 2004. – Vol. 50, № 2. – P. 107–112.
9. Djordjevic S. R. Genetic diversity among *Mycoplasma* species bovine group 7: clonal isolates from an outbreak of polyarthritis, mastitis, and abortion in dairy cattle / S. R. Djordjevic, W. A. Forbes, J. Forbes-Faulkner, P. Kuhnert, Hum S., Hornitzky M. A., Vilei E. M., Frey J. // *Electrophoresis.* – 2001. – Vol. 22, № 16. – P. 3551–3561.
10. Fomenkov A. Nucleotide sequence of a small plasmid isolated from *Acetobacter pasteurianus* / A. Fomenkov, J. P. Xiao, S. Y. Xu // *Gene.* – 1995. – 158, № 1. – P. 143–144.
11. Nesbo C. L. Recombination in *Termotoga*: implication for species concepts and biogeography / C. L. Nesbo, M. Dlutek, W. F. Doolittle // *Genetics.* – 2006. – Vol. 172, – N 2. – P. 759–769.
12. Марієвський В. Ф. Плазмиди штаму *Escherichia coli* 1257 / В. Ф. Марієвський, Н. М. Рубан, Н. М. Кролевецька, В. В. Лук'янчук, Л. В. Поліщук // *Лабораторна діагностика.* – 2006. – Т. 38, № 4. – С. 35–37.
13. Поліщук Л. В. Дослідження нуклеотидної послідовності плазмиди pEC1257 / Л. В. Поліщук, В. В. Лук'янчук, В. Ф. Марієвський, Н. М. Рубан // *Фактори експериментальної еволюції організмів (збірник наукових праць. Присвячено 90-річчю від часу заснування Української академії наук).* – К.: Лорос. – 2008. – Т.4. – С. 202–205.
14. Wertz J. E. Chimeric nature of two plasmid of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B / J. E. Wertz, M. A. Riley // *J. Bacteriol.* – 2004. – 186, №6. – P.1598–1605.
15. Yang L. Characterization of pEC01, a Novel Plasmid Required for Phosphate Taxis in *Enterobacter cloacae* IFO 3320 / L. Yang, A. Kuroda, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake, J. Kato // *Microbes Environ.* – 2004. – №19. – P. 45–52.
16. Zaleski P. The complete sequece and segregation stability analysis of a new cryptic plasmid pIGWZ12 from a clinical strain of *Escherichia coli* / P. Zaleski, R. Wolinowska, K. Strzezek, A. Lakomy, A. Plucianniczak // *Plasmid.* – 2006. – 56, № 3. – P. 228–232.

L. Polishchuk, V. Marievsky, N. Ruban, V. Lukyanchuk

INVESTIGATION OF PLASMID DNA OF THREE KLINICAL STRAINES OF ESCHERICHIA COLI

Three clinical strains of *Escherichia coli* were investigated on presence of plasmid DNA. Strains 345 and 1257 contained on only one plasmid – pEC345 (5,1 kb) and pEC1257 (5,0 kp) accordingly. Three plasmids were found in strain 951: pEC951–1 (50 kb), pEC951–2 (7,2 kb) and pEC951–3 (1,7 kb). Restrictional analysis has revealed different primary structure plasmids pEC345 and pEC1257.