

Оптимизация метода селекции при конструировании мутантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*

А.С.Трунякова, Р.З.Шайхутдинова, С.В.Дентовская

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Аллельный обмен часто используется у бактерий для создания нокаутных мутантов в интересующих генах для проведения фенотипического анализа и изучения их функций. Часто понимание функции генов микроорганизмов в сложных процессах, таких как патогенез вызываемых инфекций, требует создания множества мутантных штаммов. Для оптимизации метода селекции клеток псевдотуберкулезного микроба на этапе первичной рекомбинации изучили возможность использования препаратов с антибактериальной активностью – триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета. Определили минимальные ингибирующие концентрации исследуемых селективных препаратов, а также оптимальные концентрации для селекции, выявили штаммовые отличия в чувствительности к полимиксину Б и генцианвиолету. При первичной рекомбинации триклозан, полимиксин Б и генцианвиолет полностью подавляли рост донорного штамма *Escherichia coli* S17(λ pir), тем самым позволяя эффективно провести отбор мутантного штамма *Yersinia pseudotuberculosis* 85 Δ surA pCad⁺.

Ключевые слова: селективный агент, конъюгативный перенос, *Yersinia*

Для цитирования: Трунякова А.С., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В. Оптимизация метода селекции при конструировании мутантных штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Бактериология. 2024; 9(3): 64–66. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-64-66

Optimization of selection method in the construction of mutant strains of *Yersinia pseudotuberculosis*

A.S.Trunyakova, R.Z.Shaikhutdinova, S.V.Dentovskaya

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Allelic exchange is often used in bacteria to create knockout mutants in genes of interest for phenotypic analysis and study of their function. Often, understanding the function of microbial genes in complex processes, such as the pathogenesis of infections, requires the creation of many mutant strains. To optimize the method of selection of *Yersinia pseudotuberculosis* at the stage of primary recombination, was studied the possibility of using drugs with antibacterial activity – triclosan, polymyxin B and gentian violet. The minimum inhibitory concentrations of the studied selective drugs was determined, as well as the optimal concentrations for selection. Strain differences in sensitivity to polymyxin B and gentian violet were identified. During primary recombination, triclosan, polymyxin B, and gentian violet completely suppressed the growth of the donor strain *Escherichia coli* S17(λ pir), thereby allowing effective selection of the mutant strain *Y. pseudotuberculosis* 85 Δ surA pCad⁺.

Key words: Selective agent, conjugative transfer, *Yersinia*

For citation: Trunyakova A.S., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V. Optimization of selection method in the construction of mutant strains of *Yersinia pseudotuberculosis*. Bacteriology. 2024; 9(4): 64–66. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-64-66

Одним из самых распространенных способов создания нокаутных мутантов грамотрицательных бактерий является сайт-направленный мутагенез с использованием для аллельного обмена суицидных векторов, например несущих точку начала репликации R6K, которые способны репли-

цироваться только в штаммах, продуцирующих ϕ -белок из λ -фага [1]. Суицидные векторы можно использовать для осуществления аллельного обмена гена дикого типа на мутантную аллель, кодируемую плазмидой. Аллельный обмен является двухэтапной процедурой с интеграцией плазмиды в

Для корреспонденции:

Трунякова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0102

Статья поступила 29.03.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Alexandra S. Trunyakova, junior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0102

The article was received 29.03.2024, accepted for publication 25.12.2024

целевой ген путем рекомбинации с последующим ее удалением посредством второго кроссинговера. Реципиентные бактериальные клетки отбирают с помощью маркерного антибиотика, используемого для инактивации целевого гена (первое событие рекомбинации), при этом для удаления донорного штамма можно использовать второй селективный агент. Элиминацию интегрированной плазмиды, которая приводит к аллельному обмену (второе событие рекомбинации), ведут с использованием маркеров для контрселекции [2, 3] и подтверждают утратой устойчивости к антибиотику, ген которого кодируется суицидным вектором [1].

Одним из способов получения делеционных мутантов *Yersinia pseudotuberculosis* является конъюгативный перенос суицидных векторов, содержащих модифицированные гены [2]. Для селекции реципиентных штаммов чумного микроба при создании нокаутных мутантов с использованием суицидного вектора pCVD442, вводимого методом конъюгативного переноса из донорного штамма *Escherichia coli* S17, успешно используют полимиксин Б [4]. В случае сайт-направленного мутагенеза псевдотуберкулезного микроба спектр селективных агентов, позволяющих эффективно отобрать реципиентный штамм от донора после конъюгации, недостаточно изучен.

Целью настоящего исследования является оптимизация метода селекции клеток псевдотуберкулезного микроба на этапе первичной рекомбинации с использованием препаратов с антибактериальной активностью – триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета.

Материалы и методы

В исследовании использовали штаммы псевдотуберкулезного микроба серотипов O:3 (*Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ и *Y. pseudotuberculosis* H-4795), O:1b (*Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺) и *E. coli* S17λpir/pCVD442 в качестве контрольного штамма.

Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) возможных селективных агентов полимиксин Б, триклозан и генцианвиолет последовательно разводили в бульоне LB начиная с концентрации 2000, 16667 и 50 мкг/мл соответственно. В качестве контроля брали среду LB без добавления селективных агентов. В среду добавляли 10⁷ КОЕ исследуемых штаммов и инкубировали в течение суток при температуре 28°C. Выживание оценивали путем фотометрии при 620 нм с использованием анализатора Multiskan Labsystems (Финляндия).

Конъюгативный перенос и отбор первичных рекомбинантов осуществляли как описано ранее [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Выбранные для тестирования препараты относятся к разным классам: триклозан – полихлорфеноксибензол, полимиксин Б – полипептидный антибиотик, а генцианвиолет – основной краситель трифенилметанового ряда.

Известно, что триклозан при высоких концентрациях (0,2–2%) обладает бактерицидным действием, повреждая цитоплазму и мембрану бактериальных клеток, при невысоких концентрациях (0,001–0,01%) проявляет бактериостатические свойства, подавляя синтез жирных кислот, что позволяет использовать препарат в селективных средах [5]. Действие полимиксина Б преимущественно основано на способности связываться с фосфатными группами липида А молекул липополисахаридов бактерий, что приводит к нарушению барьерных функций клеточной стенки и к гибели клеток [6]. В штаммах *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, в отличие от штаммов *E. coli*, фосфатные группы защищены 4-амино-4-дезоксид-арабинозой (Ara4N) уменьшающей вероятность связывания полимиксина Б [7]. Поэтому полимиксин Б традиционно используется при селективном отборе. Генцианвиолет обладает высокой бактериостатической активностью в отношении грамположительных бактерий (1:500000 – 1:650000); против грамотрицательных бактерий действует только в концентрациях от 1:1000 (*E. coli*, *Salmonella Typhi*) до 1:40000 (*Shigella dysenteriae*). Такая дифференциальная чувствительность различных бактерий к генцианвиолету позволяет использовать его при изготовлении селективных сред [8, 9].

Для изучения чувствительности штаммов *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* к действию антибактериальных агентов определили МИК полимиксина Б, триклозана и генцианвиолета методом серийных разведений в жидкой питательной среде (таблица).

Донорный штамм кишечной палочки проявлял повышенную чувствительность к триклозану, полимиксину Б и генцианвиолету, подавляющим рост в концентрациях 8, 1,95 и 4,75 мкг/мл соответственно. Обнаружили штаммовые отличия в чувствительности: штамм *Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ был в 4 раза более чувствителен к полимиксину Б, чем *Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺ и *Y. pseudotuberculosis* H-4795 и в 2 раза устойчивее к генцианвиолету. Отличий в устойчивости штаммов *Y. pseudotuberculosis* к триклозану не было обнаружено. Устойчивость штаммов псевдотуберкулезного микроба превышала устойчивость кишечной палочки в 2, 250–1000 и 3–8 раз к триклозану, полимиксину Б и генцианвиолету, соответственно.

Оптимальной концентрацией полимиксина Б для селекции мутантных штаммов на основе *Y. pseudotuberculosis*

Таблица. Минимальная ингибирующая концентрация триклозана, полимиксина Б и генцианвиолета в плотной питательной среде
 Table. Minimum inhibitory concentration of triclosan, polymyxin B and gentian violet in solid nutrient medium

Штамм / Strain	МИК, мкг/мл / MIC mcg/ml		
	Триклозан (иргазан) / Triclosan (irgasan)	Полимиксин Б / Polymyxin B	Генцианвиолет / Gentian violet
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 85pCad ⁺	16	250	25
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 529-3260 pVM82 ⁺ pCad ⁺	16	1000	12,5
<i>Y. pseudotuberculosis</i> H-4795	16	1000	12,5
<i>E. coli</i> S17λpir/pCVD442	8	1,95	4,75

85pCad⁺ является диапазон 2–250 мкг/мл; для генцианвиолета – 5–25 мкг/мл, триклозана – 10–15 мкг/мл. Для штаммов *Y. pseudotuberculosis*H-4795 и *Y. pseudotuberculosis* 529-3260 pVM82⁺pCad⁺ оптимальная концентрация полимиксина Б находится в диапазоне 2–1000 мкг/мл, генцианвиолета – 5–12,5 мкг/мл.

Эффективность выбранных селективных агентов изучили на этапе первичной рекомбинации штамма *Y. pseudotuberculosis* 85pCad⁺ с мутацией в гене *surA*. Донорный штамм *E. coli* S17(λpir) элиминировали добавлением в среду культивирования триклозана (10 мкг/мл), полимиксина Б (50 мкг/мл), генцианвиолета (10 мкг/мл). Селективные агенты полностью подавляли рост донорного штамма. Эффективность роста мутантного штамма *Y. pseudotuberculosis* 85Δ*surA* pCad⁺, содержащего суицидный вектор pCVD442, на среде с добавлением триклозана составила $3,5 \cdot 10^2$ КОЕ/мл, полимиксина Б – $3,9 \cdot 10^2$ КОЕ/мл, генцианвиолета – $2,6 \cdot 10^2$ КОЕ/мл.

Заключение

Таким образом, исследуемые антибактериальные препараты могут быть использованы для подавления роста донорных штаммов кишечной палочки при конъюгации, а также могут быть взаимозаменяемы при обнаружении отсутствия устойчивости у разных псевдотуберкулезных штаммов.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol. 1988 Jun;170(6):2575-83. DOI: 10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988
2. Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using of positive-selection suicide vector. Infect Immun. 1991;59:4310-4317. DOI: 10.1128/iai.59.12.4310-4317.1991
3. Selbitschka W, Niemann S, Puhler A. Construction of gene replacement vectors for Gram (–) bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;38:615-618.
4. Дентовская СВ, Иванов СА, Копылов ПХ, Шайхутдинова РЗ, Платонов МЕ, Комбарова ТИ, и др. Избирательная протективность Δ*nlpD*-мутантов *Yersinia pestis*. Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2015;1(24):108-115.
5. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin

- agar. J Clin Microbiol. 1986 Jul;24(1):116-20. DOI: 10.1128/jcm.24.1.116-120.1986
6. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat. 2010;13(4-5):132-8. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002
7. Титарева ГМ, Фурсова НК, Балахонов СВ. Штаммовые отличия *Yersinia pestis* по чувствительности к бактерицидному действию полимиксина В. Успехи современного естествознания. 2003;10:100.
8. Лебедева МН. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. Учебное пособие. Медгиз, 1973.
9. Руководство по профилактике чумы. Под ред. Наумова АВ, Самойловой ЛВ. Саратов, 1992.

References

1. Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. J Bacteriol. 1988 Jun;170(6):2575-83. DOI: 10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988
2. Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using of positive-selection suicide vector. Infect Immun. 1991;59:4310-4317. DOI: 10.1128/iai.59.12.4310-4317.1991
3. Selbitschka W, Niemann S, Puhler A. Construction of gene replacement vectors for Gram (–) bacteria using a genetically modified *sacRB* gene as a positive selection marker. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;38:615-618.
4. Dentsovskaya SV, Ivanov SA, Kopylov PK, Shaikhutdinova RZ, Platonov ME, Kombarova TI, et al. Selective protective potency of *Yersinia pestis* Δ*nlpD*-mutants. Acta Naturae. 2015;7(1):102-108. (In Russian).
5. Fukushima H, Gomyoda M. Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype O3 inhibited on cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar. J Clin Microbiol. 1986 Jul;24(1):116-20. DOI: 10.1128/jcm.24.1.116-120.1986
6. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug Resist Updat. 2010;13(4-5):132-8. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002
7. Titareva GM, Fursova NK, Balakhonov SV. Shtammovye otlichiya *Yersinia pestis* po chuvstvitel'nosti k bakteritsidnomu deistviyu polimiksina V. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2003;10:100. (In Russian).
8. Lebedeva MN. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po meditsinskoj mikrobiologii. Uchebnoe posobie. Medgiz, 1973. (In Russian).
9. Rukovodstvo po profilaktike chumy. Pod red. Naumova AV, Samoilovoi LV. Saratov, 1992. (In Russian).

Информация об авторах:

Шайхутдинова Рима Завдатовна, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории микробиологии чумы отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about authors:

Rima Z. Shaikhutdinova, senior researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Svetlana V. Dentsovskaya, MD, PhD, DSc, major researcher of laboratory for plague microbiology State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор