



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1761806 A1

(51)5 C 12 N 15/31 // (C 12 N 15/31,
C 12 R 1: 19)

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1

(21) 4854156/13
(22) 27.06.90
(46) 15.09.92. Бюл. № 34
(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков
(72) С.Б.Вакуленко, Е.Г.Энтина, И.П.Фомина и С.М.Навашин
(56) Allmansberger R. et al. Mol. Gen. Genet., 1985, 198, 514-520.
Vliegenthart I. et al. Antimicrob. Agents. Chemother., 1989, 33, № 8, 1153-1159.

2

(54) ФРАГМЕНТ ДНК, СОДЕРЖАЩИЙ ГЕН РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АМИНОГЛИКОЗИДАМ аасС2а, КОДИРУЮЩИЙ 3'-АМИНОГЛИКОЗИДАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗУ ТИПА 11а
(57) Использование: биотехнология, генетическая инженерия. Сущность изобретения: из R-плазмиды трансконъюгата клинического штамма E.coli выделена детерминанта резистентности к гентамицину размером 2273 п.н., содержащая неизвестный ранее ген аасС2а, определена нуклеотидная последовательность этой детерминанты. 2 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генетической инженерии, и представляет собой фрагмент ДНК, обуславливающий синтез 3'-аминогликозидацетилтрансферазы.

3'-аминогликозидацетилтрансфераза — фермент, продуцируемый клиническими штаммами микроорганизмов и обуславливающий инактивацию таких клинически важных антибиотиков, как гентамицин, тобрамицин, сизомицин и нетилмицин, в результате чего продуцирующий этот фермент штамм микроорганизма приобретает резистентность к перечисленным антибиотикам.

Известны детерминанты резистентности, кодирующие гены аасС2 и продуцирующие фермент ААС(3)-11. Гены аасС2 выделены из штаммов, распространенных в Чили и Нидерландах.

На основании известной нуклеотидной последовательности сконструирован ДНК-зонд, представляющий собой SphI-Sall фрагмент ДНК размером 0,8 т.п.н.

Целью изобретения является создание ДНК-зонда для выявления неизвестного ранее гена аасС2а.

Типы аминогликозидинактивирующих ферментов можно определить по профилю резистентности штаммов к аминогликозидным антибиотикам. По профилю резистентности, детерминанта устойчивости, клонированная нами, кодирует фермент типа ААС(3)-11а, не описанный ранее и отличающийся по профилю резистентности от фермента типа ААС(3)-11 более высоким уровнем резистентности к изепамицину — аминогликозиду, используемому для определения типов ферментов, инактивирующих гентамицин.

Для выявления штаммов микроорганизмов, содержащих ген, кодирующий фермент ААС(3)-11а, необходимо выделить детерминанту резистентности содержащую распространенный в СССР ген 3'-аминогликозидацетилтрансферазы типа 11а и на основании его нуклеотидной последовательности сконструировать ДНК-зонд. Этот зонд, используемый для выявления гена аасС2 в клинических штаммах микроорга-

(19) SU (11) 1761806 A1

низмов, может применяться в химиотерапии гнойно-септических и особо опасных инфекций.

Для достижения поставленной цели из R-плазмиды трансконъюганта штамма *E. coli*, продуцирующего фермент AAC(3)-11a, клонирована детерминанта резистентности к гентамицину, представляющая собой Hind III фрагмент размером около 2,3 т.п.н., и при помощи метода Сангера определена нуклеотидная последовательность этой детерминанты резистентности. Нуклеотидная последовательность Hind III фрагмента содержащего ген *aacC2a*, приведена в табл. 1.

Ген, входящий в состав секвенированной детерминанты резистентности, содержит открытую рамку считывания размером 856 п.н., кодирующую фермент AAC(3)-11 и локализованную между 819 и 1676 нуклеотидами, начиная от 5' конца. Показано, что ген кодирует белок с мол.м. 30,6 килодальтон. Выявлено, что секвенированный ген содержит отличный от известных ранее промотор и ряд нуклеотидных замен в структурной части. Эти изменения позволяют отнести секвенированный нами ген к типу *aacC2a*.

В табл. 2 представлены регуляторные области гена *aacC2* из плазмид *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3*, а также секвенированного гена *aacC2a*. Регуляторные области гена *aacC2* из плазмид *pWP14a* и *pWP116a* идентичны регуляторной области плазмиды *pJVO3* за исключением участка протяженностью 20 п.н., присутствующего в промоторной области плазмиды *pJVO3*. Последовательность длиной 20 п.н. плазмиды *pJVO3* содержит альтернативный – 10 бокс промотора. В регуляторной области секвенированного гена в направлении к 5' концу, начиная от старт-кодона, расположен участок длиной 18 п.н., совпадающий с таковыми регуляторных областей генов *aacC2* плазмид *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3*. В этом участке расположена последовательность Шайна-Дальгарно GG AG. За гомологичным участком расположена последовательность длиной 9 п.н., отсутствующая в генах, секвенированных ранее. Далее вновь следует область длиной 8 п.н., присутствующая в плаزمиде *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3*. Вслед за участками гомологии в гене из плазмиды *pSV11* (плазмида *pUC19*, содержащая Hind III фрагмент с геном *aacC2a*) следует протяженная область, абсолютно отличающаяся от регуляторных областей генов *aacC2* плазмид *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3*.

При сравнении структурной части секвенированного гена с геном из плазмиды

pWP113a показано наличие 3,5% замен нуклеотидов и 5,6% аминокислотных замен в молекуле фермента. При сравнении структурной части секвенированного гена со структурными частями генов *aacC2* плазмид *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3* выявлено 3,15% нуклеотидных замен и 4,2% аминокислотных замен в молекуле фермента. На основании этих данных можно сделать вывод, что секвенированный нами ген эволюционно ближе к гену из плазмид *pWP14a*, *pWP116a* и *pJVO3*.

При сравнении последовательности структурной части секвенированного гена с последовательностями структурных частей генов *aacC2* плазмид *pWP14a*, *pWP116a*, *pJVO3* и *pWP113a* обнаружено в общей сложности 43 нуклеотидные замены, определяющие 20 аминокислотных замен в молекуле фермента, т.е. наблюдается 5,0% различий в нуклеотидном составе и 7,3% – в аминокислотном. Нуклеотидные замены, обуславливающие замены аминокислот в последовательности гена, локализованы достаточно случайным образом. На основании определения степени гомологии секвенированного гена и известных генов *aacC2*, секвенированный ген отнесен к типу *aacC2a*.

Для достижения цели сконструирован ДНК-зонд, основанный на неизвестной ранее заявленной нуклеотидной последовательности клонированного фрагмента ДНК, содержащего ген *aacC2a*. ДНК фрагмента размером 2273 п.н. подвергнут гидролизу эндонуклеазой рестрикции *EcoR V*, образовавшиеся фрагменты разделены методом электрофореза в агарозном геле, фрагмент размером 537 п.н. элюирован из агарозы, очищаем при помощи двукратной экстракции фенолом и двукратного осаждения этанолом. Полученный таким образом фрагмент ДНК радиоактивно или нерадиоактивно метят и используют в экспериментах по ДНК-ДНК гибридизации.

Пример. Клетки клинического штамма *E. coli* 164, резистентного к гентамицину, тобрамицину, сизомицину, нетилмицину и продуцирующего фермент AAC(3)-11a, выращивают в L-бульоне в течение ночи при 37° С. Из бактериальной суспензии изолируют ДНК R-плазмиды, имеющую мол.м. 70 Мд и содержащую детерминанту резистентности к гентамицину, тобрамицину, сизомицину и нетилмицину. Выделенную ДНК гидролизуют эндонуклеазой рестрикции Hind III и лигируют с ДНК векторной плазмиды *pUC19*, гидролизованной эндонуклеазой Hind III. Смесь, содержащей лигированные молекулы, трансформируют реципиентный штамм *E. coli* JM 101. Транс-

форманты, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирают на агаризованных средах, содержащих гентамицин в концентрации 10 мкг/мл. Отобранные трансформанты засевают до отдельных колоний на агаризованной среде LB, содержащей 10 мкг/мл гентамицина. Отдельную колонию выращивают в жидкой питательной среде LB в течение ночи и выделяют ДНК щелочным методом. Проводят в стандартных условиях гидролиз плазмидной ДНК эндонуклеазной рестрикции Hind III и в присутствии маркеров молекулярной массы устанавливают, что детерминанта резистентности к гентамицину, сизомицину, тобрамицину и нетилмицину находится в составе Hind III фрагмента размером 2,3 т.п.н.

При помощи метода Сэнгера определяют нуклеотидную последовательность клонированной детерминанты резистентности. В результате компьютерной обработки результатов ген отнесли к типу aacC2a.

Из лабораторного штамма *E. coli*, содержащего рекомбинантную плазмиду pSV11, щелочным методом выделяют плазмидную ДНК в препаративных количествах. Проводят рестрикцию плазмидной ДНК эндонуклеазой Eco RV. Фрагмент размером 537 п.н. вырезают из геля, проводят электроэлюцию в диализный мешок, очищают двукратной экстракцией фенолом, двукратным осажде-

нием этанолом. Радиоактивное мечение фрагмента проводят реакцией ник-трансляции. Радиоактивно меченый фрагмент используют в качестве зонда в экспериментах по ДНК-ДНК гибридизации.

Таким образом, определена нуклеотидная последовательность гена aacC2a. Сконструированный на основании этой последовательности гибридационный зонд, представляющий собой Eco RV фрагмент размером 537 п.н., может быть использован для выявления этого гена. Полученный в результате осуществления поставленной цели зонд радиоактивно или нерадиоактивно метят и используют в экспериментах по ДНК-ДНК гибридизации. Результаты, полученные при гибридизации со сконструированным из ДНК гена aacC2a зондом, могут применяться для рационального выбора антибиотика в химиотерапии гнойно-септических и особо опасных инфекций.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Фрагмент ДНК, содержащий ген резистентности к аминогликозидам aacC2a, кодирующий 3'-аминогликозидацетилтрансферазу типа 11a, полученный в результате элюции из геля продукта гидролиза рестриктазой Hind III рекомбинантной плазмиды pSV11, реплицируемой в лабораторном штамме *Escherichia coli* K12, размером 2273 п.н. со следующей нуклеотидной последовательностью.

Т а б л и ц а 1

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
 1 TTTGGTACTC TCAGAAATACC CTTTGGAGTT CGTTTTTGTG CCAACAGAAC AGCCCGTAGG TAAATCTCGG AGCATTTCAG BAASTGTCTG TGTBAGTTGA ATCTBAATGG
 111 CAGTTAATAT TTTAGTGGTC AAGGTCTTAG GCGAGTTGAA TGCAGGGC6A CCTCGTTTTT TGGCAGGCCG TTTTACAACA GGAGGGAGAA CTATTTTCTC AACACCTTCC
 221 CGTGGTGGAA TCATGGTTGC ATCAGGAGCT AATATGAGCG ATTAACGTAT CCGCAAGATT GGACTTCACC ATCTGCTCAT GAACGCGAGT GGTAGTTTA CCGCTGCAA
 331 ATTCA6CAAA AACACGGCTA AATGTCCCTT CGCTGGGTAG TTTTTTATAC AGATTGAAGC CGCAAAATCG CCGCAATCTA CGATCAACTT CTAGGCGTTC AATCAAGCCC
 441 CGTGGTGGCA CBATACCAAG TTCAGCTTTT GCAATAAAAG GCACATGCGA AAGCGCAGCG GTCAGCAGGA GGTCTTCCCA CAGCACACCC TTGATATTGG TATACCAAGG
 551 ATTCGATGTC ACTCCACTCG AGCACACGAA TAATGCBTTC GAGCTTTGAG CTGATGCCGT CCTAAATCGG CTGCGACTAA AGGAATAAGT TCGTATTSTA AGGCTTGAAA
 661 CCGTGTGTTG AGAAAAGGGC TTAATGTAGT ATTCATGCTG TAGATGTTAG GGTGTTGGTT TAGAAGCTCA TTTTAAACATC TACAACCTTT TTCAAAAAAT GTTAAATCAG
 771 GCTGTTTGTG GAGTTTTGCA AGTGCCTCGA TTTAGAGGAG ATATCGCGAT GCATACGCGG AAGGCAATAA CCGAGGCGCT TCAAAAACTC GGAGTCCAAA CCGGTGACCT
 881 ATTGATGGTG CATGCCCTAC TTAAGCGAT TGGTCCGTC GAAGGAGGAG CCGAGACGGT CGTTGCCGCG TTACGCTCCG CCGTTGGCC GACTGCACT GTGATGGGAT
 991 ACGCATCGTG GCACCGATCA CCTAGGAGG ASACTCGTAA TGGCGCTCGG TTGATGACA AAACCGCGG TACCTGGCG CCGTTCGATC CCGCAACGCG CCGGACTTAC
 1101 CGTGGTGGTG GCCTGCTGAA TCAGTTTCTG GTTCAAGCCG CCGCGCGCGG GCGCAGCGCG CACCCCGATG CATGATGGT CCGGTTGGT CCACTGGCTG AAACGCTGAC
 1211 GAGGCTCAC AAGCTCGTCC ACGCCTTGGG GGAAGGCTCG CCGCTCGAGC GGTTCGTTCC CCTTGGCGGG AAGGCCCTGC TGTGGGTGC GCGCTAAAC TCCGTTACC6
 1321 CATTGCACTA CCGCGAGGCG GTTCCGATA TCCCAACAA AGGCGGGTG AGTATGAGA TCCCGATGCT TGGAAGCAAC GCGCAAGTCC CCGSAAAAAC GGCATCGGAT
 1431 TACGATTCAA ACGCATTCTC CBATTGCTTT GCTATCGAAG GAAAGCCGGA TGCCTCGAA ACTATAGCAA ATGCTTACGT GAAGTCCGGT CCGCATCGAG AAGGTGCTGT
 1541 GGGCTTTGCT CAGTGTACC TGTTCGAGC GCAGGACATC GTGACGTTCC GCGTCACCTA TCTTGAGAG CATTTCGGAA CCACTCCGAT CGTGCCAGCA CACGAGTCC6
 1651 CCGAGTCTC TTGCGAGCCT TCAGTTAGA GCGCGTCCAC AATGATAATC TGGATCAAGC GACCTTTCGG GCGGGGAAAG ACGACGCTCG CTGAGCGGTT GCGCBATCC6
 1761 GGTCCAAAT CGTGTCTT TGACCCCGAG CAAATCGGT TCGTTGTGAA AGAAACGGT CCGATGCCGG CAGCGGAGA CTATCAGGAT CTCCTATTAT GCAATTAATC
 1871 CAAAACTGC CCASAAAGT AATAATCTAG AATCTTTCC DTTGAGTATT CAAGGAACT TCTAATAAAT ATTATTCAAG AAAATAAACA ATCTATTCAA AAAATTGAG6
 1981 AAATATTACA TACCATAATA CCTGTTAGT TATCTGAGA TTCTGAAAT GAATATCAAC GAGTCTGTC AAAATCAATA AATGAGCAT TTAAGAACTG CCGAGCCAAA
 2091 SAAGGAGAAA TTATTCAAGG GCAACACATA AATAAGTTAG TGGATGTCT ACTAGAGGAA TTAAGTCTTT GATATAATCA TAACATCAAG AAATAGACCA TTGATTGAG6
 2201 CAATTTCTTA AAGTCTAGT AGTCAZATCT AGTGTCTTG AAPTTCAT AITCCGATA CCGTCTTT TAA

Т а б л и ц а 2

(pWP116A) Met His Thr Arg Lys Ala Ile Thr Glu Ala Ile Arg Lys Leu Gly Val
 (pSV11) 1 Met His Thr Arg Lys Ala Ile Thr Glu Ala Leu Gln Lys Leu Gly Val
 (pWP113A) Met His Thr Gln Lys Ala Ile Thr Glu Ala Leu Gln Lys Leu Gly Val

Gln Thr Gly Asp Leu Leu Met Val His Ala Ser Leu Lys Ala Ile Gly Pro Val Glu
 17 Gln Thr Gly Asp Leu Leu Met Val His Ala Ser Leu Lys Ala Ile Gly Pro Val Glu
 Gln Thr Ser Asp Leu Leu Met Val His Ala Ser Leu Lys Ser Ile Gly Pro Val Glu

Gly Gly Ala Glu Thr Val Val Ala Ala Leu Arg Ser Ala Val Gly Pro Thr Gly Thr
 36 Gly Gly Ala Glu Thr Val Val Ala Ala Leu Arg Ser Ala Val Gly Pro Thr Gly Thr
 Gly Gly Ala Glu Thr Val Val Ala Ala Leu Arg Ser Ala Val Gly Pro Thr Gly Thr

Val Met Gly Tyr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Glu Thr Leu Asn Gly Ala
 55 Val Met Gly Tyr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Glu Thr Arg Asn Gly Ala
 Val Met Gly Tyr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Glu Thr Leu Asn Gly Ala

Arg Leu Asp Asp Lys Ala Arg Arg Thr Trp Pro Pro Phe Asp Pro Ala Thr Ala Gly
 74 Arg Leu Asp Asp Lys Thr Arg Arg Thr Trp Pro Pro Phe Asp Pro Ala Thr Ala Gly
 Arg Leu Asp Asp Asn Ala Arg Arg Thr Trp Pro Pro Phe Asp Pro Ala Thr Ala Gly

Thr Tyr Arg Gly Phe Gly Leu Leu Asn Gln Phe Leu Val Gln Ala Pro Gly Ala Arg
 93 Thr Tyr Arg Gly Phe Gly Leu Leu Asn Gln Phe Leu Val Gln Ala Pro Gly Ala Arg
 Thr Tyr Arg Gly Phe Gly Leu Leu Asn Gln Phe Leu Val Gln Ala Pro Gly Ala Arg

Arg Ser Ala His Pro Asp Ala Ser Met Val Ala Val Gly Pro Leu Ala Glu Thr Leu
 112 Arg Ser Ala His Pro Asp Ala Ser Met Val Ala Val Gly Pro Leu Ala Glu Thr Leu
 Arg Ser Ala His Pro Asp Ala Ser Met Val Ala Val Gly Pro Leu Ala Glu Thr Leu

Thr Glu Pro His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Glu Gly Ser Pro Val Glu Arg Phe
 131 Thr Glu Pro His Lys Leu Gly His Ala Leu Gly Glu Gly Ser Pro Val Glu Arg Phe
 Thr Glu Pro His Glu Leu Gly His Ala Leu Gly Glu Gly Ser Pro Asn Glu Arg Phe

Val Arg Leu Gly Gly Lys Ala Leu Leu Leu Gly Ala Pro Leu Asn Ser Val Thr Ala
 150 Val Arg Leu Gly Gly Lys Ala Leu Leu Leu Gly Ala Pro Leu Asn Ser Val Thr Ala
 Val Arg Leu Gly Gly Lys Ala Leu Leu Leu Gly Ala Pro Leu Asn Ser Val Thr Ala

Leu His Tyr Ala Glu Ala Val Ala Asp Ile Pro Asn Lys Arg Trp Val Thr Tyr Glu
 169 Leu His Tyr Ala Glu Ala Val Ala Asp Ile Pro Asn Lys Arg Arg Val Thr Tyr Glu
 Leu His Tyr Ala Glu Ala Val Ala Asp Ile Pro Asn Lys Arg Trp Val Thr Tyr Glu

Met Pro Met Leu Gly Arg Asn Gly Glu Val Ala Trp Lys Thr Ala Ser Glu Tyr Asp
 188 Met Pro Met Leu Gly Ser Asn Gly Glu Val Ala Trp Lys Thr Ala Ser Asp Tyr Asp
 Met Pro Met Pro Gly Arg Asp Gly Glu Val Ala Trp Lys Thr Ala Ser Asp Tyr Asp

Ser Asn Gly Ile Leu Asp Cys Phe Ala Ile Glu Gly Lys Pro Asp Ala Val Glu Thr
 207 Ser Asn Gly Ile Leu Asp Cys Phe Ala Ile Glu Gly Lys Pro Asp Ala Val Glu Thr
 Ser Asn Gly Ile Leu Asp Cys Phe Ala Ile Glu Gly Lys Gln Asp Ala Val Glu Thr

Ile Ala Asn Ala Tyr Val Lys Leu Gly Arg His Arg Glu Gly Val Val Gly Phe Ala
 226 Ile Ala Asn Ala Tyr Val Lys Leu Gly Arg His Arg Glu Gly Val Val Gly Phe Ala
 Ile Ala Asn Ala Tyr Val Lys Leu Gly Arg His Arg Glu Gly Val Val Gly Phe Ala

Gln Cys Tyr Leu Phe Asp Ala Gln Asp Ile Val Thr Phe Gly Val Thr Tyr Leu Glu
 245 Gln Cys Tyr Leu Phe Asp Ala Gln Asp Ile Val Thr Phe Gly Val Thr Tyr Leu Glu
 Gln Cys Tyr Leu Phe Asp Ala Gln Asp Ile Val Thr Phe Gly Val Thr Tyr Leu Glu

Lys His Phe Gly Ala Thr Pro Ile Val Pro Ala His Glu Ala Ala Gln Arg Ser Cys
 264 Lys His Phe Gly Thr Thr Pro Ile Val Pro Ala His Glu Val Ala Ala Glu Cys Ser Cys
 Lys His Phe Gly Thr Thr Pro Ile Val Pro Ala His Glu Ala Ile Glu Arg Ser Cys

Glu Pro Ser Gly
 283 Glu Pro Ser Gly
 Glu Pro Ser Gly