



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1761807 A1

(51)5 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.
(54) ШТАММ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*, СОДЕРЖАЩИЙ РЕКОМБИНАНТ-

2

НУЮ ПЛАЗМИДНУЮ ДНК pSV11, КОДИРУЮЩУЮ 3'-АМИНОГЛИКОЗИДАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗУ
(57) Использование: биотехнология, генетическая инженерия. Сущность изобретения: сконструирована рекомбинантная плазмидная ДНК pSV11, содержащая детерминанту с геном aacC2a. Данной плазмидой трансформируют штамм-реципиент *E.coli* K12JM101, получен рекомбинантный штамм, задепонирован в коллекции ВНИИА под номером 2С75. 1 табл.

Изобретение относится к биотехнологии и, в частности к генетической инженерии, и представляет штамм, полученной методом генетической инженерии и содержащий в составе рекомбинантной плазмиды детерминанту резистентности к гентамицину, сизомицину, тобрамицину и нетилмицину, обуславливающую синтез 3'-аминогликозидацетилтрансферазы типа IIa.

3'-аминогликозидацетилтрансфераза типа IIa – 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.

Целью изобретения является создание генно-инженерного штамма, содержащего в своем составе ген aacC2a, и продуцирующего 3'-аминогликозидацетилтрансферазу типа IIa.

Ген aacC2a, входящий в состав рекомбинантной плазмиды, может быть использован для конструирования ДНК-зонда, используемого при детекции гена aacC2a или близкородственных ему генов методом ДНК-ДНК гибридизации.

Для достижения поставленной цели была сконструирована рекомбинантная плаزمида pSV11, состоящая из векторной плазмиды pUC19, в полилинкер которой встроены HindIII фрагмент клонированной и секвенированной детерминанты резистентности, содержащей ген aacC2a. При помощи метода Сэнгера определена нуклеотидная последовательность этой детерминанты резистентности.

(19) SU (11) 1761807 A1

Нуклеотидная последовательность клонированного из клинического штамма *E.coli* и секвенированного нами HindIII фрагмента ДНК приведена в таблице.

Ген, входящий в состав секвенированной детерминанты резистентности, содержит открытую рамку считывания размером 856 п.н., кодирующую фермент AAC(3)-IIa и локализованную между 819 и 1676 нуклеотидами, начиная от 5' конца. Показано, что ген кодирует белок мол.м. 30,6 килодальтон.

При сравнении последовательности структурной части секвенированного гена с последовательностями структурных частей генов *aacC2* плазмид *rWP14a*, *rWP116a*, *rJV03* и *rWP113a* обнаружено в общей сложности 43 нуклеотидные замены, определившие 20 аминокислотных замен в молекуле фермента, т.е. наблюдается 5,0% различий в нуклеотидном составе и 7,3% – в аминокислотном.

Выявлено, что секвенированный ген содержит отличный от известных ранее промотор и ряд нуклеотидных замен в структурной части. На основании определения степени гомологии секвенированного гена с известными генами *aacC2*, секвенированный ген отнесен к типу *aacC2a*.

Сконструированной рекомбинантной плазмидой, имеющей в своем составе секвенированный ген *aacC2*, трансформируют лабораторный штамм *E.coli* K 12 JM101.

Для достижения цели использован штамм *Escherichia coli* коллекция ВНИИА N 2075 – содержащий рекомбинантную плазмиду *rSV11*, содержащую в своем составе фрагмент с геном *aacC2a*. Штамм получен трансформацией штамма *E.coli* JM101 плазмидой *rSV11*.

Штамм *Escherichia coli* коллекция ВНИИА N 2075 характеризуется следующими признаками.

Морфологические признаки.

Клетки прямые, палочковидной формы 1,2-1,6x2,0x6,0 мкм, подвижные, с перитрихияльными жгутиками, грамотрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки.

Клетки хорошо растут на простых питательных средах.

При росте на мясо-пептонном агаре, питательном агаре "Дифко" – колонии гладкие, круглые, прижаты, блестящие, серые, край ровный, мутные.

При росте в жидких средах: мясо-пептонном бульоне, L-бульоне образуют ровную, интенсивную муть.

Физиолого-биохимические признаки.

Клетки растут в пределах 4 – 45 С при оптимуме pH 6,8 – 7,5.

Проявляют устойчивость к ампициллину, обусловленную наличием гена *bla* в векторной части плазмиды *rSV11*, а также резистентность к гентамицину, сизомицину, тобрамицину и нетилмицину, обусловленную геном *aacC2*, входящим в состав рекомбинантной плазмиды *rSV11*.

Пример. Клетки клинического штамма *E.coli* 164, резистентного к гентамицину, тобрамицину, сизомицину, нетилмицину, и продуцирующего фермент AAC(3)-IIa, выращивают в L-бульоне в течение ночи при 37°C. 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 HindIII и лигируют с ДНК векторной плазмиды *rUC19*, гидролизованной эндонуклеазой HindIII. Смесь, содержащей лигированные молекулы, трансформируют реципиентный штамм *E.coli* JM101. Трансформанты, 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 эндонуклеазой рестрикции HindIII и в присутствии маркеров молекулярной массы устанавливают, что детерминанта резистентности к гентамицину, сизомицину, тобрамицину и нетилмицину находится в составе HindIII фрагмента размером 2,3 т.п.н.

Таким образом, плаزمида *rSV11*, полученная в результате встраивания HindIII фрагмента R-плазмиды клинического штамма *Escherichia coli* размером 2,3 т.п.н. в полилинкер векторной плазмиды *rUC19*, содержит в своем составе ген резистентности к гентамицину, сизомицину, тобрамицину и нетилмицину.

При трансформации рекомбинантной плазмидой реципиентного штамма *E.coli* K12 JM101, получают штамм, содержащий ген *aacC2a* и продуцирующий 3-аминогликозидацетилтрансферазу типа IIa.

Штамм *Escherichia coli*, содержащий рекомбинантную плазмиду, культивируют в L-бульоне в течение ночи в присутствии гентамицина в концентрации 5 мкг/мл. Из 200 мл ростовой среды, когда концентрация клеток достигнет стационарной фазы, щелочным методом выделяют плазмидную

ДНК. При этом выделяется приблизительно 50-80 мкг плазмидной ДНК со 100 мл бульона. Проводят рестрикцию 10 мкг плазмидной ДНК эндонуклеазой рестрикции Eco RV. Фрагмент размером 537 п.н. вырезают из геля, проводят его электроолиюцию в диализный мешок, очищают двукратной экстракцией фенолом, двукратным осаждением этанолом. Радиоактивное мечение фрагмента проводят реакцией ник-трансляции. Радиоактивно меченый фрагмент используют в качестве зонда в экспериментах по ДНК-ДНК гибридизации.

Таким образом при использовании полученного нами штамма *Escherichia coli* коллекция ВНИИА N 2075, содержащего

рекомбинантную плазмиду с геном аасС2а, можно сконструировать ДНК-зонд, специфичный для гена аасС2а. Этот ДНК-зонд может применяться для детекции резистентных к гентамицину клинических штаммов, содержащих ген аасС2а, и вследствие этого, наиболее рационального выбора антибиотика при химиотерапии гнойно-септических и особо опасных инфекций.

Формула изобретения

Штамм бактерий *Escherichia coli* ВНИИА № 2075, содержащий рекомбинантную плазмидную ДНК рSV11, кодирующую 3'-аминогликозидацетилтрансферазу.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
1  TTTGGTACTC TCAGATACC CTTTGGATT CTTTTTGTG CCAACAGAC ACCCCGTAGG TAAATCTCG AGCATTTCAG GAATGTCTG TGTGAGTGA ATCTGATGG
111 CAGTTAATAT TTAGTGGTC AAGGTCTTAC GCGAGTGTAA TGCAGGGGGA CDTGTTTTT TGGCAGGCGG TTTTACAACA GGAAGGAGAA CTATTTTCTC AACACTTGG
221 GGTGCTGGAA TCATGTTTGC ATCAGGACT AATATGACCG ATTACGCTAT CCGCAAGATT GGACTTCACD ATCTGCTCAT GAAGCGGAGT GGTAGTITA GCGCTGCAA
331 ATTCAGCAAA AACACGGCTA AATGTCCCTT GGTGAGTAG TTTTTTATAC AGATTTAAGC CCAAAATTCG CCGCAATCTA CGATCAACTT CTAGCGCTTC AATCAAGGCC
441 GGTGCTGGAA CGATACCAAG TTCAGCTTTT GCAATAAAGG GCACATGCGA AAGGCGAGCG GTGAGCAGGA GGTCTTCCCA CAGCACACCC TTGATATTGG TATACCAAGG
551 ATTCGATGTC ACTCCACTCG AGCACACGAA TAATGCTTTC GAGCTTTGAG CTGATGCGCT CCTAAATCGG CTGCGACTAA AGCAATAAGT TCGTATTGTA AGGCTTGAAG
      -35 TTGACA      -30 TATAAT
661 CGGTTGTTTG AAAAAAGGGC TTAATGTAGT ATTCATGCTG TAGATGTTAG GGTGTTGTTT TAGAAGCTCA TTTTAACTC TACAACCTTT TTCAAAATAT GTTAATTCAG
771 GCTGTTTGTG GAGTTTTGCA AGTGCCTCGA TTTAGAGGAG ATATCGGCTT GATAGCGGG AAGGCAATAA CCGAGGCGCT TCAAAAATCT GAGTGCDAAG CCGGTGACT
881 ATTGATGTTG CATGCTCAC TTAAGGCTAT TGGTGGTTC GAGGAGGAG GAGAGAGGCT GTTGCGCGG TTACGCTCGG CGGTTGGGCC GACTGGCACT GTGATGGAT
991 ACGCATGCTG GGACCGATCA CCTACGAGG AGACTGCTAA TGGCTGCGG TTGATGACA AAACCGCGCG TACTTGGCGG CCGTTCGATC CGCAACGGCG CCGGACTTAC
1101 GGTGGTTTGG GCTGCTGAA TCAGTTTCTG GTTCAAGGCC CCGCGCGCGG GCGAGCGCGG CACCCCGATG CATGATGCT GCGGTTGCT CCACTGGCTG AAAGGCTGAC
1211 GGAGCTCAC AAGTCCGTC ACAGCTTGGG GGAAGGCTCG CGCTCGAGG GGTGCTTCG CTTGCGCGG AAGGCCCTGC TGTGGGTC GCGCTAAC TCGGTTACG
1321 CATTGCACTA CGCCGAGGCG GTTGGCGATA TCGGCAACA AGGCGGCTG AGTATGAGA TCGGATGCT TGGAGCAGC GCGCAAGTGG CCGGAAAG GCGATCGAT
1431 TACGATCAA ACGGCTTCT GATTGCTT GCTATCGAG GAAAGCGG TCGGCTGAA ACTATAGCAA ATGCTTACCT GAGGCTGCT GCGATCGAG AAGGTGCTG
1541 GGGCTTTGCT CAGTGTACC TGTTCAGGG GAGGACATC GTGAGTTCG GGTGACCTA TTTGAGAGG CATTTCGGAA GCACTCGGAT GGTGCGCA CAGGAGTGG
1651 CCGAGTCTC TTGCGAGCT TCAGTTAGG GCGGCTGAG AATGATAATC TGGATCAAG GACCTTTGGG CCGGGAAG AGACGCTCG CTGAGCGGT GCGGATCGG
1761 GGTCCAAAT GCTGATCTT TGAAGCGAG GAAAGGCTT TCGTTGTA AAAAAAGCT CCGATGCGG GAGCGGAGA CTATCAGGAT TCGTATAT GCAATTAAT
1871 CAAAAACTGC CGAGAAAT AATAATGAG AATCTTTC CTGAGTAT CAAAGGACT TGAATAAAT ATTATCAAG AAAAAACA ATCTATCAA AAAAAAGG
1981 AAATATTACA TACCATAATA CCGTTCAGT TATCTGAGG TCTGAAAT GAATATAGC GAGTGTGTC AAATCAATA AATGAGCA TTAAGACTG CCGAGCGAA
2091 GAAGGAGAAA TTATTCAAGG GAAACATG TATAAGTAG TAGAATGCT ACTAGAGAA TTAAGTCTT GATATATCA TAACTCAAG AATAGAGCA TTAATGAA
2201 CAATTTCTA AAGTCTAGT AGTCAAGCT GCTGCTTTT AATTTCAAT ATTCGCGATA CCGTCTTTT TAA

```