

# Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ

Н.А.Шишкова, Г.М.Вахрамеева, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, И.А.Дятлов

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

Проведена оптимизация условий плазмидной криотрансформации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В экспериментах использовали плазмидный вектор рPMC1, способный автономно реплицироваться в бактериях рода *Francisella*. Показаны необходимость наличия ионов магния в трансформационном буфере и важность использования минимального объема трансформационной смеси при замораживании-оттаивании. Оптимизированный протокол позволяет получать до  $1 \times 10^7$  трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК, что сравнимо с эффективностью электропорации плазмидной ДНК рPMC1 в клетки туляремийного вакцинного штамма.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, криотрансформация, оптимизация, фаза роста

**Для цитирования:** Шишкова Н.А., Вахрамеева Г.М., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Дятлов И.А. Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ. Бактериология. 2018; 3(2): 38–42. DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42

## Plasmida cryotransformation of vaccin strain *Francisella tularensis* 15 NIEG

N.A.Shishkova, G.M.Vakhrameyeva, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, I.A.Dyatlov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The optimization of the conditions for plasmid cryotransfusion of the vaccine strain *F. tularensis* 15 NIEG was carried out. The plasmid vector pPMC1, which is autonomously replicable in bacteria of the genus *Francisella*, was used in the experiments. Both necessity of the presence of magnesium ions in the transformation buffer and the importance of using the minimum volume of the transformation mixture during freezing-thawing are shown. The optimized protocol allows to obtain up to  $1 \times 10^7$  transformants per 1 µg of plasmid DNA, which is comparable to the efficiency of the electroporation of pPMC1 plasmid DNA into the cells of the tularemia vaccine strain.

**Keywords:** *Francisella tularensis* 15 NIEG, cryotransformation, optimization, growth phase

**For citation:** Shishkova N.A., Vakhrameyeva G.M., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Dyatlov I.A. Plasmida cryotransformation of vaccin strain *Francisella tularensis* 15 NIEG. Bacteriology. 2018; 3(2): 38–42. (In Russian). DOI: 10.20953/2307-6631-2018-2-38-42

**Д**ля профилактики туляремии в России используют живую туляремийную вакцину, созданную на основе штамма *Francisella tularensis subsp. holarctica* 15 линии НИИЭГ. У вакцинированных людей формируется длительный (не менее 5 лет) иммунитет, защищающий от заражения возбудителем туляремии подвида *holarctica*, циркулирующим на территории Евразии [1]. В литературе имеются сведения о потере протективных свойств вакцинного штамма при хранении и в процессе производства вакцинного препарата [1], а также описаны случаи гиперреакций у людей после иммунизации коммерческой туляремийной вакциной [2]. Поэтому создание живой туляремийной вакцины

с минимальными побочными действиями и стабильно наследуемыми иммуногенными свойствами является актуальной задачей.

Для решения данной проблемы созданы молекулярные инструменты и методики, позволяющие целенаправленно изменять геном вакцинного штамма *F. tularensis* [3]. Генетические структуры в клетки *F. tularensis* вводят, как правило, методом трансформации [4–8], а также методами конъюгации [9] и мобилизации [10]. Известны три варианта трансформации бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК: два общих для вида *F. tularensis* – с помощью электропорации и замораживания-оттаивания, и один химический метод –

### Для корреспонденции:

Мокриевич Александр Николаевич, доктор медицинских наук, заведующий отделом особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ

Телефон: (4967) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

Статья поступила 20.04.2018 г., принята к печати 27.06.2018 г.

### For correspondence:

Alexander N. Mokrievich, MD, PhD, DSc, head of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0117

E-mail: mokrievich@obolensk.org

The article was received 20.04.2018, accepted for publication 27.06.2018

для подвида *novicida* [11]. По литературным данным, метод электропорации более эффективен по сравнению с методом криотрансформации [12, 13].

**Целью настоящей работы** являются повышение эффективности криотрансформации вакцинного штамма туляремиального микроба и выявление факторов, влияющих на данный процесс.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы и плазмиды.** Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице 1.

**Питательные среды и условия культивирования.** Штаммы *F. tularensis* выращивали на плотной питательной среде ФТА, содержащей в 1 л: 300 мл готового агара Хоттингера, 6,3 г агара, 10 г высушенной крови крупного рогатого скота, 10 г глюкозы, 0,5 г цистеина, 0,025 г тиамин хлорида, рН 7,2.

Для культивирования бактерий *F. tularensis* в жидкой питательной среде использовали предложенную ранее среду [15] с рядом модификаций (ФТВ) (1 л среды содержал: кислотный гидролизат казеина – 5 г, дрожжевой экстракт – 5 г, калия фосфат однозамещенный – 12 г; калия гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г, сульфат железа (II) 7-водного – 6 мг, глюкоза – 2 г; рН среды 7,2).

При необходимости в питательные среды добавляли 100 мкг/мл полимиксина В и 3 мкг/мл хлорамфеникола (См).

Культивирование проводили при температуре 37°C. Жидкие культуры растили в колбах или пробирках в термостатируемой качалке GFL 3032 (200 об./мин). Пробирки с культурами находились на платформе в скошенном положении.

**Манипуляции с ДНК.** Выделение плазмидной ДНК из клеток *F. tularensis* проводили по методике, описанной в работе [16].

**Криотрансформация бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК.** Для трансформации использовали раствор ДНК рРМС1 с концентрацией 50 мкг/мл в ТЕ-буфере (1 mM ЭДТА, 10 mM трис-буфер, рН 7,5) и трансформационный буфер (ТБ): 0,1 M MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, рН 7,5. рН ТБ доводили с помощью раствора 1 M NaOH.

Бактериальную суспензию для посева готовили следующим образом. Ночную агаровую культуру суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) (0,15 M натрия хлорида, 0,01 M однозамещенного калия фосфата, 0,015 M двухзамещенного натрия фосфата, рН 7,6) до оптической плотности, соответствующей 10 ЕД стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012 ФГБУ НЦЭСМП). 0,2 мл полученной суспензии высевали газоном на чашку Петри диа-

метром 9 см с ФТА и инкубировали при температуре 37°C в течение 20 ч. Выросшую культуру собирали петлей и суспендировали в ФТВ до концентрации сырой биомассы 10 мг/мл.

Для приготовления культуры в вегетативной фазе роста в микробиологическую пробирку с 1,5 мл ФТВ вносили 0,5 мл посевного материала и культивировали на качалке (200 об./мин) при температуре 37°C в течение 2,5 ч. Затем 1 мл культуры отбирали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и клетки осаждали на центрифуге (Centrifuge 5417R, Eppendorf) при 12000 об./мин в течение 3 мин при комнатной температуре. Надосадочную жидкость полностью удаляли и осадок ресуспендировали в 20 мкл ТБ.

Для криотрансформации в бактериальную суспензию вносили 2 мкл раствора ДНК рРМС1 (данный объем раствора ДНК был использован во всех экспериментах) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Пробирку с трансформационной суспензией замораживали в жидком азоте в течение 5 мин, после чего прогревали 5 мин при температуре 37°C. К прогретой суспензии добавляли 500 мкл ФТВ, перемешивали и затем пробирку инкубировали в течение 2 ч в термостате при температуре 37°C. Высевы из исходной суспензии и 10-кратных разведений в ЗФР проводили по 0,1 мл на три чашки с плотной питательной средой, содержащей См.

**Электропорация бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК.** Электропорацию вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ плазмидной ДНК проводили по методике [6] с модификациями: 2,5 мл посевной бактериальной суспензии в концентрации 10 мг/мл ФТВ вносили в колбу объемом 100 мл с 7,5 мл ФТВ и культивировали 2,5 ч на качалке в режиме 200 об./мин при температуре 37°C. Для приготовления 4 образцов для электропорации брали 4 мл подорошенной бактериальной культуры и осаждали на центрифуге (Centrifuge 5417R, Eppendorf) 3 мин, 10 000 об./мин при комнатной температуре. Осадки ресуспендировали в 1 мл 0,5 M сахарозы, осаждали и повторно ресуспендировали в 200 мкл 0,5 M растворе сахарозы. Для электропорации 2 мкл раствора ДНК смешивали с 50 мкл сахарозной суспензии бактерий и переносили в кювету для электропорации с зазором между электродами 1 мм. Электропорацию проводили на приборе «Electroporator 2510» (Eppendorf) при напряжении 1750 В и времени импульса 5 ± 0,5 мсек. После электрического разряда содержимое кюветы переносили в 1,5 мл центрифужную пробирку с 1 мл ФТВ и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч. Высевы из исходной суспензии и 10-кратных разведений в ЗФР проводили по 0,1 мл на три чашки с плотной питательной средой, содержащей См.

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник или ссылка
Штаммы		
<i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ	subsp. <i>holarctica</i> , вакцинный штамм	«ГКПМ-Оболенск»*
<i>F. tularensis</i> 15(рРМС1)	штамм 15 НИИЭГ с плазмидой рРМС1, фенотип См <sup>R</sup>	«ГКПМ-Оболенск» [14]
Плазмиды		
рРМС1	Плазмидный вектор на основе репликона рFNL10 размером 4259 п.о., несущий ген <i>cat</i> из плазмиды рС194.	[14]

\*Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора.

## Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что для криотрансформации бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК необходимо наличие ионов магния в ТБ, кроме этого, эффективность трансформации повышалась при использовании буфера с щелочными значениями pH [4]. В настоящей работе мы использовали трехкомпонентный буферный раствор, состоящий из ионов магния, сульфата и аммония для поддержания необходимой величины pH. Данный буфер отличался от ранее описанного отсутствием солей трис-ацетата и хлористого калия.

### Влияние посевной дозы на компетентность клеток в логарифмической фазе роста

При сравнении компетентности трех выращенных образцов бактериальных культур, полученных после засева в ФТВ ночной агаровой культуры с начальными весовыми концентрациями сырой биомассы: А – 5 мг/мл (что соответствовало концентрации бактериальных клеток  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл), Б – 2,5 мг/мл и В – 1,25 мг/мл, были получены следующие результаты: для образца А –  $1,25 \times 10^5$ , Б –  $3,5 \times 10^5$  и для В –  $0,6 \times 10^5$  колоний трансформантов (для приготовления одного образца компетентных клеток использовали 1 мл культуры; в трансформационную смесь вносили 100 нг ДНК рРМС1). Таким образом, посевная доза бактерий *F. tularensis* при подрачивании культуры в ФТВ перед этапом замораживания-оттаивания влияла на эффективность трансформации, и наилучшие результаты были получены для образца Б. Для определения количества трансформантов учитывали результаты подсчета колоний на чашках из разведений, содержащих от  $3 \times 10^3$  до  $3 \times 10^1$  бактерий с плазмидой в 1 мл.

При подсчете количества живых бактерий в образце Б на всех этапах проведения эксперимента оказалось, что через 2,5 ч роста количество живых клеток увеличилось с  $2,5 \times 10^9$  КОЕ до  $6,3 \times 10^9$  КОЕ, а после этапов замораживания-оттаивания и последующего подрачивания в течение 2 ч уменьшилось до  $3,85 \times 10^9$  КОЕ. Разброс количества выросших колоний на трех чашках при высеве из одного разведения был менее 15 % от среднеарифметического значения в этой и последующих сериях экспериментов.

Эффективность криотрансформации для образца Б в пересчете на 1 мкг плазмиды рРМС1 составила  $5,6 \times 10^{-4}$  от числа колоний, выросших на чашках в отсутствие селективного давления.

### Оптимизация объема и состава трансформационной смеси

Было приготовлено 10 мл бактериальной культуры, подращенной в колбе объемом 100 мл после засева ночной агаровой культурой в весовой концентрации 2,5 мг/мл. Затем из колбы отбирали по 1 мл культуры в 5 пластиковых конических пробирок объемом 1,5 мл и клетки осаждали. Три осадка (I–III) ресуспендировали в 20, 40 и 80 мкл ТБ, а два осадка (IV и V) – в 20 мкл 0,1 М раствора хлористого калия и в 20 мкл ФТВ соответственно. Кроме этого, была приготовлена бактериальная суспензия (VI) в 80 мкл ТБ из 4 мл культуры. В образец VI вносили 8 мкл плазмидной ДНК, тогда как в остальные образцы – по 2 мкл. Образцы I–V

Таблица 2. Влияние объема трансформационной смеси на количество трансформантов

№ п/п	Объем трансформационной смеси, мкл	Количество трансформантов, $\times 10^5$
I	20	8,4
II	40	4,1
III	80	0,6

Таблица 3. Влияние аэрации на выход трансформантов

Условия предварительного выращивания	Количество трансформантов, $\times 10^5$
С аэрацией в течение 2,5 час	7,5
Без подрачивания	0,007

после криотрансформации подрачивали в 0,5 мл ФТВ, а образец VI – в 2 мл ФТВ и высевали на селективные чашки. Результаты эксперимента для образцов I–III приведены в таблице 2.

Увеличение объема трансформационной смеси с 20 до 80 мкл негативно повлияло на эффективность криотрансформации.

Замена в трансформационной среде сернокислого магния на хлористый калий (образец IV) приводила к снижению количества трансформантов с  $8,4 \times 10^5$  до  $0,64 \times 10^5$ , а использование ФТВ (образец V) вместо раствора ТБ приводило также к уменьшению эффективности криотрансформации с  $8,4 \times 10^5$  до  $0,66 \times 10^5$ . Таким образом, полученные данные подтверждают ранее сделанный вывод о необходимости использования высокой концентрации ионов магния в трансформационной смеси [4].

Увеличение количества бактерий с  $6,3 \times 10^9$  кл (образец I) до  $2,5 \times 10^{10}$  кл (образец VI) и вносимой ДНК с 0,1 мкг до 0,4 мкг в 80 мкл ТБ не привело к пропорциональному увеличению количества трансформантов. Было получено  $6,8 \times 10^5$  колоний в варианте VI, тогда как в варианте I –  $9,4 \times 10^5$  колоний, что превышало количество трансформантов с использованием 80 мкл бактериальной суспензии. Данный результат указывает на необходимость проведения этапа замораживания-оттаивания в минимальном объеме. Не обнаружено существенного отличия в снижении выживаемости для образцов I и VI после замораживания-оттаивания: I –  $4,9 \times 10^9$  КОЕ, а VI –  $2,2 \times 10^{10}$  КОЕ.

### Влияние фазы роста бактерий на эффективность криотрансформации

Для выяснения этого вопроса были приготовлены два образца бактериальной культуры в пробирках: засеянная культура подрачивалась с аэрацией (образец I); использовали для криотрансформации культуру без подрачивания (образец II). В обоих случаях посевным материалом служила ночная агаровая культура с дозой засева 2,5 мг/мл. Результаты криотрансформации этих вариантов культур приведены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что компетентность бактерий возросла в вегетативно-активной фазе роста культуры в ФТВ.

### Зависимость количества трансформантов от массы вносимой плазмидной ДНК

Количество вносимой ДНК в трансформационную смесь коррелировало с числом получаемых трансформантов (табл. 4).

Таблица 4. Влияние количества вносимой ДНК на выход трансформантов

Масса ДНК в трансформационной смеси, нг	Количество трансформантов, $\times 10^5$
1	0,81
10	8,3
100	94

Из таблицы 4 следует, что линейная зависимость количества получаемых трансформантов от количества внесенной в трансформационную смесь ДНК сохраняется как минимум в диапазоне от 1 нг до 100 нг. Насыщающий уровень количества ДНК для образца компетентных клеток, содержащих  $6,3 \times 10^9$  КОЕ, превышает 100 нг.

При использовании для трансформации плазмидной ДНК, предварительно проинкубированной с ДНК-лигазой (1 ед активности) в лигазном буфере (10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM диэтилтреитола, 0,5 mM АТФ, 40 mM  $Tris \cdot HCl$ , pH 7,8), эффективность криотрансформации снижалась до  $1 \times 10^5$  колоний, тогда как то же количество плазмидной ДНК в ТЕ-буфере приводило к появлению  $9,4 \times 10^5$  трансформантов.

Критичным компонентом в составе буфера для криотрансформации в предлагаемом варианте являются ионы магния. В литературе описан протокол проведения криотрансформации бактерии *F. novicida* и представителей других подвидов *F. tularensis* с использованием 0,1 М раствора хлористого кальция и 10 mM хлористого рубидия в трансформационном буфере [17–20]. Таким образом, можно сделать предположение о взаимозаменяемости щелочноземельных ионов в процессе криотрансформации. Кальциевый вариант в 3–10 раз менее эффективен, чем метод электропорации [11, 13].

Предлагаемый нами вариант криотрансформации, в отличие от варианта с использованием хлористого кальция, сравним по эффективности с электропорацией. Однако препарат ДНК для электропорации должен обладать низкой электропроводностью. Это требование исключает использование препаратов ДНК, взятых непосредственно из реакционной смеси после лигирования. В случае криотрансформации данное условие не является обязательным. Использование неочищенного препарата ДНК в составе трансформационного буфера приводило к снижению эффективности трансформации в 10 раз по сравнению с обессоленным и очищенным препаратом ДНК. Тем не менее в этом случае возможно получить довольно представительную популяцию трансформантов (порядка  $1 \times 10^5$  трансформантов на 0,1 мкг ДНК).

Предложенный вариант криотрансформации позволяет получать до  $1 \times 10^7$  трансформантов на 1 мкг плазмидной ДНК. Сравнение удельной эффективности на 1 мкг одного и того же препарата плазмидной ДНК методами криотрансформации и электропорации в клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ показало их подобность, что указывает на возможность взаимозаменяемости этих подходов в большинстве случаев.

Уменьшение объема трансформационной смеси, использованной для замораживания-оттаивания, приводит к увеличению эффективности криотрансформации. Данное наблюдение, вероятно, указывает на необходимость краткого временного интервала перехода клеток (их мембран) из обычного состояния в замороженное и обратно.

Компетентность клеток *F. tularensis* зависит от фазы роста культуры. Так, ночная агаровая культура обладает на три порядка меньшей компетентностью по сравнению с культурой, подрощенной в ФТВ в течение времени, достаточного для одного клеточного цикла деления. Данное наблюдение может указывать на отличие структуры клеточных стенок у покоящихся и делящихся клеток *F. tularensis*.

Проведенные исследования позволили оптимизировать условия криотрансформации плазмидных ДНК в клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

### Финансирование

Работа выполнена в рамках НИР 048 «Изучение механизмов патогенеза и иммуногенеза туляремийной инфекции и мониторинг за циркуляцией возбудителя в отдельных регионах Российской Федерации» Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

### Литература

- Олсуфьев НГ. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина, 1975, 192 с.
- Медуницын НВ. Вакцинология. М.: Триада-Х, 1999, 272 с.
- Павлов ВМ, Дятлов ИА. Молекулярно-генетические исследования бактерий рода *Francisella* и их прикладное значение. М., 2012, 267 с.
- Мокриевич АН, Фурсов ВВ, Павлов ВМ. Криотрансформация туляремийного микроба плазмидной ДНК. Проблемы особо опасных инфекций. 1994;4:186-90.
- Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):253-56
- Pomerantsev AP, Golovliov IR, Ohara Y, Mokrievich AN, Obuchi M, Norqvist A, et al. Genetic organization of the *Francisella* plasmid pFNL10. Plasmid. 2001 Nov;46(3):210-22. DOI: 10.1006/plas.2001.1548
- Norqvist A, Kuoppa K, Sandstrom G. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):257-60.
- Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. FEMS Microbiol Lett. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
- Мокриевич АН, Шишкова НА, Дятлов ИА, Павлов ВМ. Особенности конъюгативного переноса плазмиды pSa между *Escherichia coli* и *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:80-2.
- Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
- Zogaj X, Klose KE. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. Front Microbiol. 2011 Jan 5;1:142. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00142.
- LoVullo ED, Sherrill LA, Perez LL, Pavelka MS. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Microbiology. 2006 Nov;152(Pt 11):3425-35. DOI: 10.1099/mic.0.29121-0
- Le Pihive E, Blaha D, Chenavas S, Thibault F, Vidal D, Valade E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis*. Plasmid. 2009; 62:147–157. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.07.001
- Кравченко ТБ, Платонов МЕ, Вахрамеева ГМ, Баннов ВА, Кудрявцева ТЮ, Мокриевич АН, Павлов ВМ. Клонирование и экспрессия протективных антигенов *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B и ESAT-6 в клетках *Francisella tularensis* 15/10. Биохимия. 2007;72(7):905-14.

15. Лапин АА, Павлов ВМ, Мокриевич АН, Домотенко ЛВ, Храмов МВ. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2009;4(102):66-7.
16. Павлов ВМ, Родионова ИВ, Мокриевич АН, Мещерякова ИС. Выделение и молекулярно-генетическая характеристика криптической плазмиды из штамма *Francisella novicida* like F6168. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1994;3:39-40.
17. Liu J, Zogaj X, Barker JR, Klose KE. Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Biotechniques. 2007 Oct;43(4):487-90, 492. DOI: 10.2144/000112574
18. Rodriguez SA, Yu JJ, Davis G, Arulanandam BP, Klose KE. Targeted inactivation of *Francisella tularensis* genes by group II introns. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2619-26. DOI: 10.1128/AEM.02905-07.
19. Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. Microbiology. 2008 Jul;154(Pt 7):2139-50. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018077-0.
20. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu JJ, Rodriguez SA, Liu J, et al. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1459-70.
14. Kravchenko TB, Platonov ME, Vahrameeva GM, Bannov VA, Kudryavtseva TJu, Mokrievich AN, Pavlov VM. Cloning and expression of protective antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B and ESAT-6 in *Francisella tularensis* 15/10. Biochemistry (Moscow). 2007;72(7):905-14.
15. Lapin AA, Pavlov VM, Mokrievich AN, Domotenko LV, Khramov MV. Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2009;4(102):66-7. (In Russian).
16. Pavlov VM, Rodionova IV, Mokrievich AN, Meshcheryakova IS. Isolation and molecular genetic characterization of a cryptic plasmid from the strain *Francisella novicida* like F6168. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 1994;3:39-40. (In Russian).
17. Liu J, Zogaj X, Barker JR, Klose KE. Construction of targeted insertion mutations in *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Biotechniques. 2007 Oct;43(4):487-90, 492. DOI: 10.2144/000112574
18. Rodriguez SA, Yu JJ, Davis G, Arulanandam BP, Klose KE. Targeted inactivation of *Francisella tularensis* genes by group II introns. Appl Environ Microbiol. 2008 May;74(9):2619-26. DOI: 10.1128/AEM.02905-07.
19. Zogaj X, Chakraborty S, Liu J, Thanassi DG, Klose KE. Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. Microbiology. 2008 Jul; 154(Pt 7):2139-50. DOI: 10.1099/mic.0.2008/018077-0.
20. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu JJ, Rodriguez SA, Liu J, et al. The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1459-70.

## References

1. Olsuf'ev NG. Taksonomiya, mikrobiologiya i laboratornaya diagnostika vzbuditelya tulyaremiy [Taxonomy, microbiology and laboratory diagnosis of the causative agent of tularemia]. Moscow: "Meditsina" Publ., 1975, 192 p. (In Russian).
2. Medunitsyn NV. Vaksinologiya [Vaccinology]. Moscow: "Triada-Kh", 1999, 272 p. (In Russian).
3. Pavlov VM, Dyatlov IA. Molekulyarno-geneticheskie issledovaniya bakterii roda *Francisella* i ikh prikladnoe znachenie [Molecular-genetic studies of bacteria of the genus *Francisella* and their application value]. Moscow, 2012, 267 p. (In Russian).
4. Mokrievich AN, Fursov VV, Pavlov VM. Plasmid cryotransformation of *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 1994;4:186-90. (In Russian).
5. Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Volkovoy K. Cryptic plasmid pFNL10 from *Francisella novicida*-like F6168: The base of plasmid vectors for *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):253-56
6. Pomerantsev AP, Golovliov IR, Ohara Y, Mokrievich AN, Obuchi M, Norqvist A, et al. Genetic organization of the *Francisella plasmid* pFNL10. Plasmid. 2001 Nov;46(3):210-22. DOI: 10.1006/plas.2001.1548
7. Norqvist A, Kuoppa K, Sandstrom G. Construction of a shuttle vector for use in *Francisella tularensis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996 Mar;13(3):257-60.
8. Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP, Klose KE. Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. FEMS Microbiol Lett. 2003 Dec 12;229(2):195-202.
9. Mokrievich AN, Shishkova NA, Dyatlov IA, Pavlov VM. Peculiarities of the Conjugative pSa Plasmid Transfer from *Escherichia coli* into *Francisella tularensis*. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;2:80-2. (In Russian).
10. Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A, Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol Lett. 2003 May 28;222(2):273-80.
11. Zogaj X, Klose KE. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. Front Microbiol. 2011 Jan 5;1:142. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00142.
12. LoVullo ED, Sherrill LA, Perez LL, Pavelka MS. Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Microbiology. 2006 Nov;152(Pt 11):3425-35. DOI: 10.1099/mic.0.29121-0
13. Le Pihive E, Blaha D, Chenavas S, Thibault F, Vidal D, Valade E. Description of two new plasmids isolated from *Francisella philomiragia* strains and construction of shuttle vectors for the study of *Francisella tularensis*. Plasmid. 2009; 62:147–157. DOI: 10.1016/j.plasmid.2009.07.001

## Информация о соавторах:

Шишкова Нина Андреевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Вахрамеева Галина Михайловна, научный сотрудник отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

Павлов Виталий Михайлович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией микробиологии туляремии отдела особо опасных инфекций ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

Дятлов Иван Алексеевич, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003

## Information about co-authors:

Nina A. Shishkova, PhD (Biol), leading researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Galina M. Vahrameeva, researcher of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Vitaliy M. Pavlov, PhD, DSc (Biol), head of the laboratory of microbiology of tularemia of the department of highly dangerous infections, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003

Ivan A. Dyatlov, Academician of RAS, MD, PhD, DSc, professor, director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003