

Поэтапное выделение внеклеточной и геномной ДНК на примере микобактерий

А.В.Ильинов^{1,2}, А.Г.Савицкая³, О.Е.Хохлова⁴, Ю.С.Винник¹, О.В.Теплякова¹

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация;

²Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Цель исследования. Разработать протокол раздельного выделения внеклеточной и геномной ДНК оптимальной концентрации и чистоты на примере микобактерий.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы микобактерий *Mycobacterium intracellulare* и *Mycobacterium avium*. Выделение ДНК проводили из культур бактерий в начале экспоненциальной фазы роста. Выделение внеклеточной ДНК с поверхности бактериальных клеток проводили путем инкубации в ТЕ-буфере с последующим мягким центрифугированием. Надосадочную жидкость использовали для получения внеклеточной ДНК, из осадка клеток получали геномную ДНК. Для апробации метода использовали краситель RMAxx™, инкубировали клетки бактерий с RMAxx™ перед выделением ДНК. Полученные образцы использовали как матрицу для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Результаты. Получены образцы внеклеточной и геномной ДНК из *M. intracellulare* и *M. avium* с концентрацией и чистотой, оптимальными для проведения ПЦР-РВ. Получены образцы геномной ДНК *M. intracellulare* (41 нг/мкл) и *M. avium* (39,2 нг/мкл). Внеклеточная ДНК *M. intracellulare* получена в концентрации 9,23 нг/мкл, *M. avium* – 6,1 нг/мкл. Обработка красителем RMAxx™, ковалентно связывающимся с молекулами ДНК, препятствовала амплификации участков. После окраски RMAxx™ проведено количественное определение 16S рРНК и SigA с помощью ПЦР-РВ. Инкубация с RMAxx™ привела к снижению геномной ДНК максимум в 1,8 раза. В образцах внеклеточной ДНК инкубация с RMAxx™ вызвала снижение количества 16S рРНК и SigA в 5 раз.

Заключение. Данный метод применим для получения образцов внеклеточной и геномной ДНК бактерий в необходимых количестве и чистоте для проведения последующего анализа

Ключевые слова: микобактерии, геномная ДНК, полимеразная цепная реакция, внеклеточная ДНК, пропидиум моноазид

Для цитирования: Ильинов А.В., Савицкая А.Г., Хохлова О.Е., Винник Ю.С., Теплякова О.В. Поэтапное выделение внеклеточной и геномной ДНК на примере микобактерий. Бактериология. 2025; 10(3): 51–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-51-55

Step-by-step isolation of extracellular genomic DNA of mycobacteria

A.V.Ilinov^{1,2}, A.G.Savitskaya³, O.E.Khokhlova⁴, Yu.S.Vinnik¹, O.V.Teplyakova¹

¹Prof. V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation;

²Private Healthcare Institution “Clinical Hospital” of Russian Railways Medicine Krasnoyarsk, Krasnoyarsk, Russian Federation;

³M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

⁴State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow region, Russian Federation

Для корреспонденции:

Ильинов Александр Владимирович, врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск, старший преподаватель кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
ORCID: 0000-0002-8247-1388

Статья поступила 30.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandr V. Ilinov, surgeon, Clinical Hospital “RZhD-Medicine” in Krasnoyarsk, senior lecturer of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, Prof. V.F.Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
ORCID: 0000-0002-8247-1388

The article was received 30.04.2025, accepted for publication 30.09.2025

Aim. To develop a protocol for the extraction of extracellular DNA (eDNA) and genomic DNA (gDNA) from mycobacteria, addressing erroneous concentration and purity issues.

Materials and methods. The mycobacterial strains *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium avium* were used in this study. DNA extraction was performed during the early exponential growth phase. Extracellular DNA (eDNA) was isolated from the bacterial cell surface by incubation in TE buffer, followed by gentle centrifugation. The supernatant was used to obtain eDNA, while gDNA was obtained from the cell pellet. PMAxx™ dye was utilized to differentiate between live and dead cells; bacterial cells were incubated with PMAxx™ prior to DNA extraction. The obtained samples were then used as a template for real-time PCR (RT-PCR).

Results. We successfully obtained eDNA and gDNA samples from *M. intracellulare* and *M. avium* with concentrations and purities suitable for RT-PCR. gDNA samples exhibited concentrations of 41 ng/μl for *M. intracellulare* and 39.2 ng/μl for *M. avium*. cfDNA quantities were 9.23 ng/μl for *M. intracellulare* and 6.1 ng/μl for *M. avium*. Following treatment with PMAxx™ dye, which covalently binds to DNA and prevents amplification, we quantitatively determined the levels of 16S rRNA and SigA using real-time PCR. Incubation with PMAxx™ resulted in a maximum 1.8-fold decrease in gDNA. In eDNA samples, PMAxx™ incubation caused a 5-fold decrease in the amounts of both 16S rRNA and SigA.

Conclusions. This method is applicable for extracting bacterial eDNA and gDNA with the required quantity and purity for subsequent analysis.

Key words: mycobacterium, genome DNA, polymerase chain reaction, extracellular DNA, propidium monoazide

For citation: Ilinov A.V., Savitskaya A.G., Khokhlova O.E., Vinnik Yu.S., Teplyakova O.V. Step-by-step isolation of extracellular genomic DNA of mycobacteria. Bacteriology. 2025; 10(3): 51–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-51-55

Внеклеточная ДНК (вкДНК) бактерий играет важную роль в жизнедеятельности бактериальных популяций, в частности способствует формированию биопленок, лекарственной устойчивости, участвует в горизонтальном переносе генов [1]. Несмотря на то, что геномная (гДНК) и вкДНК происходят из одной и той же клетки, они могут отличаться друг от друга в зависимости от механизма высвобождения вкДНК. Так, оказавшись вне бактериальной клетки, вкДНК может подвергнуться фрагментации, что, в свою очередь, способно изменить ее [2, 3].

У микобактерий также обнаружена вкДНК, которая является неотъемлемым компонентом биопленки. В 2015 г. Rose et al. была опубликована работа, где проводилось сравнение соотношения жизнеспособных клеток (КОЕ) в биопленке, образованной *Mycobacterium avium*, с количеством вкДНК в различные временные промежутки. Было обнаружено, что в популяции *M. avium* происходит значительное увеличение вкДНК между 1-м и 7-м днями инкубации, но при этом различия в КОЕ между этими временными точками незначительны, что предполагает наличие механизмов высвобождения ДНК, отличных от лизиса бактериальных клеток [4, 5]. Однако вопрос, какие именно это механизмы, до сих пор остается открытым [5, 6]. В качестве наиболее вероятного механизма нелитического высвобождения вкДНК у микобактерий было предложено наличие pH-зависимого экспорта вкДНК с помощью FtsK/SpoIIIE-подобного белка, ответственного за транслокацию ДНК за пределы клеточной стенки [7]. Литический механизм высвобождения вкДНК у микобактерий осуществляется профагами, активация которых приводит к высвобождению ДНК. На основании геномных сиквентов определены последовательности профагов phiRv1 и phiRv2 у *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [8], а также профаги phiMAV_1 и phiMAV_2 у *Mycobacterium avium* 104. PhiMU01 и PhiMU02 обнаружены в геноме *Mycobacterium clearans* Ag99 [9]. У *Mycobacterium marinum* описаны 10 профагов (phiMmar 01–10), среди которых есть и полноразмерные (phiMmar 02 и 08). У штаммов *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium simiae* также обнаружены профаги [10, 11].

Обнаружение в геноме микобактерий профагов говорит о возможности реализации выхода ДНК в результате активации

профага с последующим лизисом бактериальной клетки. Сравнение сиквентов вкДНК и гДНК может дать дополнительную информацию о реальных способах высвобождения вкДНК. Однако методологически достаточно трудно получить отдельные фракции вкДНК и гДНК. Жизненный цикл бактерий включает в себя формирование биопленок, матрикс которых состоит из разных компонентов, взаимодействующих друг с другом. Например, нуклеиновые кислоты могут быть связаны с белками или ионами – компонентами матрикса, что усложняет экстракцию вкДНК из матрикса; таким образом, для высвобождения вкДНК необходимо разрушить различные связи ДНК с внеклеточными белками, полисахаридами и другими полимерами. Сравнение методов экстракции вкДНК из матрикса биопленок, сформированных *Acinetobacter* sp., показало, что использование ферментов (N-гликаназа (гидролаза деградации гликопротеина), дисперсин В (гликозидгидролаза, диспергирующая биопленку) и протеиназы К (гидролаза белка) от 60 до 190 раз эффективнее [12]. В случае отдельного выделения вкДНК и гДНК необходимо избежать массового лизиса клеток для исключения попадания гДНК в образец вкДНК.

Цель исследования. В данной статье мы описываем протокол отдельного выделения вкДНК и гДНК на примере микобактерий, позволяющий выделить их в оптимальной концентрации и чистоте.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы *M. tuberculosis* var. BCG Tokyo 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 и *M. avium* subsp. *hominissuis* 104 были инкубированы до $OD_{600} = 1,5$ в бульонной среде 7H9/ADC. Бактериальную массу получали путем центрифугирования на Eppendorf Centrifuge 5417R, ротор FA-45-24-11, при 3500 об./мин, при комнатной температуре в течение 20 мин. Осадок суспендировали в 200 мкл ТЕ буфера (1 М Трис-HCl, pH 8,0 и 0,5 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), pH 8,0) в ПЦР-пробирке и замораживали при -80°C в течение 1 ч. Затем образец размораживали и добавляли к нему 100 мкл свежеприготовленной смеси хлороформа и метанола (2:1), центрифугировали при 8200 об./мин при комнатной температуре в течение 10 мин,

надосадочную жидкость удаляли, а осадок высушивали при 50°C в течение примерно 1 ч. Высушенный осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера TE с 20 мкл 1 М буфера TE-HCl, pH 9,0 и добавлением лизоцима до конечной концентрации 100 мкг/мл. Образец инкубировали при 37°C в течение ночи. По завершении инкубации в образцы добавляли протеиназу K (Invitrogen) до конечной концентрации 200 мкг/мл в присутствии 10% SDS и инкубировали при 50°C не менее 3 ч.

Для удаления белков из смеси нуклеиновых кислот добавляли 3 М раствора ацетата натрия (pH 5,2) и раствор А в объемном отношении 1:1:1. Для получения раствора А смешивали фенол / хлороформ / изоамиловый спирт в объемном соотношении 25:24:1. Перемешивали с осторожностью, путем покачивания пробирки в течение нескольких минут. Далее все образцы центрифугировали в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре. Супернатант, содержащий гДНК, переносили в стерильную пробирку типа эппендорф и осаждали добавлением неразбавленного охлажденного изопропанола. Образец центрифугировали в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре, после этого супернатант удаляли, а осадок промывали в 400 мкл 70%-го этилового спирта. Образец центрифугировали еще раз в течение 10 мин, 8200 об./мин при комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера TE и вносили RNase A (ribonuclease A) до конечной концентрации 1 мг/мл (Macherey-Nagel, Германия), после чего образцы инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После добавляли 3 М ацетата натрия (pH 5,2) и раствор А в объемном отношении 1:1:1, далее образцы были центрифугированы в течение 10 мин при 8200 об./мин при комнатной температуре. Супернатант, содержащий ДНК, переносили в чистый эппендорф и отмывали охлажденным изопропанолом и 70%-м этиловым спиртом. Полученный осадок ДНК высушивали на воздухе в течение примерно 10 мин. Растворение осадка проводили путем добавления TE-буфера с последующей инкубацией в течение ночи при 50°C. Далее образец хранился при температуре -20°C.

Выделение вкДНК проводилось с использованием протокола, описанного выше, но без этапа разрушения бактериальной мембраны (без обработки клеток лизоцимом). Полученный осадок вкДНК, растворенный в буфере TE, хранился при температуре -20°C.

Качественный и количественный анализ образцов проводился с помощью автоматизированного электрофореза Agilent 2200 TapeStation (Agilent Technologies, США).

Апробация метода выделения вкДНК проводилась на бактериальных штаммах *M. intracellulare* и *M. avium*, которые выращивали до оптической плотности $OD_{600} = 1,0$ на бульонной среде 7H9/ADC при температуре 37°C. Для сравнения эффективности метода выделения вкДНК и гДНК бактериальную суспензию разделяли на аликвоты по 400 мкл, добавляли РМАхх™ до конечной концентрации 25 мкМ и инкубировали в темноте в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем образцы подвергали воздействию светового излучающего диода (PMA-Lite™ LED Photolysis Device 50–60 Гц, 100–240 В переменного тока, выходная мощность светодиода 60 Вт, длина волны 465–475 нм) в течение 15 мин для перекрестного связывания РМАхх™ с ДНК.

После бактериальные клетки промывали и осаждали центрифугированием при 3500 об./мин в течение 10 мин. гДНК и вкДНК экстрагированы раствором А, как описано выше. Полученные образцы ДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) (CFX96 Touch Deep Well™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, Калифорния, США), направленной на амплификацию 16S рРНК и SigA. Негативным контролем являлись бактериальные клетки, убитые нагреванием при температуре 95°C в течение 5 мин.

Результаты исследования и их обсуждение

Показано влияние вкДНК на формирование бактериальных биопленок, увеличение их стабильности и устойчивости при воздействии стресса, в т.ч. при воздействии антимикробных препаратов. Механизмы высвобождения вкДНК могут быть различны, сравнение сиквенсов бактериальной вкДНК и гДНК может помочь в выявлении механизмов высвобождения вкДНК бактерий [3, 4–6]. Однако выделение молекул вкДНК, находящихся на поверхности бактерий, осложняется тем, что молекулы ДНК связаны с внеклеточными белками, полисахаридами и другими полимерами на поверхности бактериальной клетки или с компонентами биопленки. Кроме того, при манипуляциях выделения может быть высвобождена гДНК из-за разрушения бактериальных клеток в процессе выделения вкДНК. Мы адаптировали

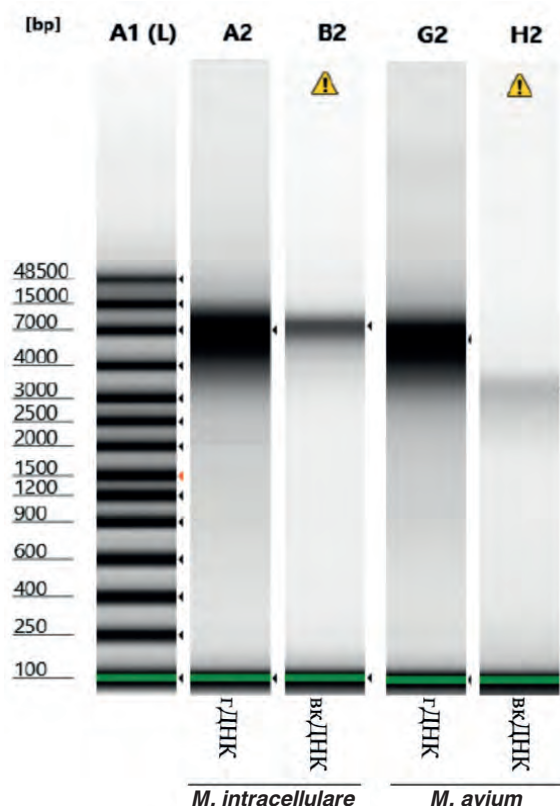


Рис. 1. Электрофореграмма ДНК клеток *M. intracellulare* и *M. avium*: A1 – маркер, A2 – гДНК *M. intracellulare*, B2 – вкДНК *M. intracellulare*, G2 – гДНК *M. avium*, H2 – вкДНК *M. avium*.

Fig. 1. Electrophoresis of DNA from *M. intracellulare* and *M. avium* cells: A1 – marker, A2 – гДНК (genomic DNA) of *M. intracellulare*, B2 – вкДНК (cell-free DNA) of *M. intracellulare*, G2 – гДНК of *M. avium*, H2 – вкДНК of *M. avium*.

метод выделения ДНК из образцов тканей человека для раздельной экстракции вкДНК микобактерий [14].

Выделение гДНК и вкДНК проводили из клеток *M. intracellulare* и *M. avium*. Перед экстракцией гДНК с поверхности бактериальных клеток была удалена вкДНК путем обработки клеток ТЕ-буфером с ЭДТА [13]. Экстракцию липидов клеточной стенки проводили по методу Фолча [14]. Лизис бактериальных клеток проводили лизоцимом в течение ночи. Инактивацию нуклеаз и очищение от белковых примесей проводили с помощью протеиназы К в присутствии SDS. Экстракцию гДНК проводили смесью фенол-хлороформ.

Выделение вкДНК *M. intracellulare* и *M. avium* проводили без разрушения клеточной стенки: клетки бактерий инкубировались с ТЕ-буфером в присутствии ЭДТА, далее клетки были отделены от буфера путем центрифугирования. Надосадочную жидкость использовали для экстракции вкДНК аналогично протоколу выделения гДНК.

Качество и количество полученных образцов гДНК и вкДНК оценивали с помощью автоматического электрофореза на установке Agilent 2200 TapeStation. Количество гДНК в образцах *M. intracellulare* и *M. avium* было примерно одинаковым – 41 и 39,2 нг/мкл соответственно. Количество вкДНК составило 9,23 нг/мкл у *M. intracellulare* и 6,1 нг/мкл у *M. avium*, что соответственно в 4,4 и в 6,4 раза меньше, чем в случае гДНК (рис. 1).

Разрушение бактериальных клеток в популяции – процесс постоянный, что не исключает попадание гДНК в образцы вкДНК. Чтобы быть уверенными, что в образце находится преимущественно вкДНК, мы провели количественное определение 16S рРНК и SigA в образцах гДНК и вкДНК, полученных из клеток, предварительно обработанных моноазидом пропидия (РМАхх™). Количественное определение 16S рРНК и SigA проводили с помощью ПЦР-РВ. Краситель РМАхх™ используется для дифференциации живых и мертвых клеток благодаря его способности проникать через мембраны неживых клеток и связываться ковалентно с двуцепочечной ДНК. При фотолизе видимым светом РМАхх™ вызывает модификацию ДНК, что исключает

Таблица. Сравнение концентраций 16S рРНК и SigA по флуоресценции красителя
Table. Comparison of 16S rRNA and SigA concentrations by dye fluorescence

	SigA		16S рРНК	
	-	+	-	+
гДНК	1,88 ± 0,22	0,99 ± 0,19	1,33 ± 0,08	0,98 ± 0,035
вкДНК	0,0238 ± 0,0035	0,0055 ± 0,0003	0,025 ± 0,0032	0,0055 ± 0,002

возможность амплификации данной молекулы ДНК с помощью ПЦР. Схема эксперимента представлена на рис. 2.

Образцы вкДНК и гДНК *M. intracellulare* и *M. avium*, обработанные / не обработанные РМАхх™, выделялись параллельно. В качестве контроля использовали клетки *M. intracellulare*, подвергнутые нагреванию. После взаимодействия с РМАхх™ образцы вкДНК и гДНК использовались как матрица для амплификации 16S рРНК и SigA с помощью ПЦР-РВ (таблица). Количество 16S рРНК во фракциях гДНК необработанной РМАхх™ составило 1,88 ± 0,16 относительных единиц (о.е.), после взаимодействия с РМАхх™ значение снизилось до 0,99 ± 0,13 о.е. Количество SigA во фракциях гДНК необработанной РМАхх™ составило 1,36 ± 0,08 о.е., после взаимодействия с РМАхх™ значение снизилось до 0,98 ± 0,13 о.е. Таким образом, обработка РМАхх™ привела к количественному снижению 16S рРНК в 1,8 раза и SigA в 1,3 раза, что может быть связано с присутствием некоторого количества нежизнеспособных клеток в популяции с поврежденной мембраной, через которую проник РМАхх™ и связался с ДНК, так как, гДНК находится внутри жизнеспособной бактериальной клетки и РМАхх™ не взаимодействует с ней из-за своей неспособности проникать через клеточную стенку живых бактерий.

Количество 16S рРНК и SigA в образцах вкДНК, даже не обработанных РМАхх™, было обнаружено в меньших количествах по сравнению с гДНК: 0,0238 ± 0,0035 о.е. и 0,0215 ± 0,0011 о.е. соответственно. Обработка РМАхх™ привела к значительному снижению количества, более чем в 4 раза, как 16S рРНК, так и SigA в образце: 0,0045 ± 0,0018 о.е. и 0,0055 ± 0,0015 о.е. соответственно. Такое снижение 16S рРНК и SigA в образце вкДНК связано с тем, что вкДНК находится на поверхности бактериальной клетки и РМАхх™ может легко связаться с молекулой и модифицировать ее, в результате чего амплификации в ходе ПЦР-РВ не происходит. Также полученные данные подтверждают незначительное присутствие (загрязнение) гДНК в образце, что может быть связано с незначительным разрушением бактериальных клеток в ходе манипуляций.

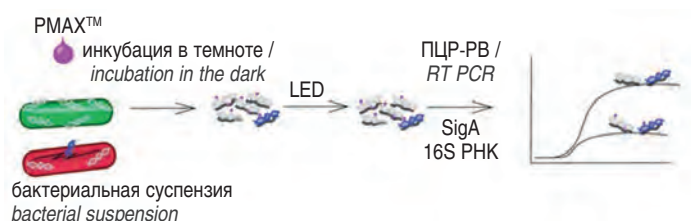


Рис. 2. Схема эксперимента с красителем РМАхх™. Зеленым окрашены жизнеспособные клетки, красным – клетки с поврежденной мембраной. Краситель (фиолетовый) действует с вкДНК (светло-серый цвет), а также с гДНК (синий цвет) поврежденных клеток. При облучении образца LED-излучением краситель ковалентно связывается с молекулами ДНК, вызывая их модификацию, и в дальнейшем препятствует амплификации данной молекулы ДНК с помощью ПЦР.

Fig. 2. Schematic of the РМАхх™ dye experiment. Viable cells are colored green, and cells with damaged membranes are colored red. The dye (violet) acts on cfDNA (light gray) and gDNA (blue) of damaged cells. When the sample is irradiated with LED light, the dye covalently binds to DNA molecules, causing their modification and, subsequently, preventing the amplification of this DNA molecule using PCR.

Заключение

Таким образом, мы продемонстрировали, что использованный протокол выделения вкДНК является эффективным, позволяет получить вкДНК с оптимальной концентрацией и чистотой.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Arenas J, Tommassen J. Meningococcal Biofilm Formation: Let's Stick Together. Trends Microbiol. 2017;25(2):113-124. DOI: 10.1016/j.tim.2016.09.005
2. Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL, Kurosawa M, Pessi G, Petty NK, et al. Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. Nat Commun. 2016 Apr 14;7:11220. DOI: 10.1038/ncomms11220
3. Deng B, Ghatak S, Sarkar S, Singh K, Das Ghatak P, Mathew-Steiner SS, et al. Novel Bacterial Diversity and Fragmented eDNA Identified in Hyperbiofilm-Forming *Pseudomonas aeruginosa* Rugose Small Colony Variant. iScience. 2020 Feb 21;23(2):100827. DOI: 10.1016/j.isci.2020.100827
4. Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* Possesses Extracellular DNA that Contributes to Biofilm Formation, Structural Integrity, and Tolerance to Antibiotics. PLoS One. 2015 May 26;10(5):e0128772. DOI: 10.1371/journal.pone.0128772
5. Barnes AM, Ballering KS, Leibman RS, Wells CL, Dunny GM. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. mBio. 2012 Jul 24;3(4):e00193-12. DOI: 10.1128/mBio.00193-12
6. Rodriguez GM, Prados-Rosales R. Functions and importance of mycobacterial extracellular vesicles. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 May;100(9):3887-92. DOI: 10.1007/s00253-016-7484-x
7. Marsollier L, Brodin P, Jackson M, Korduláková J, Tafelmeyer P, Carbonnelle E, et al. Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. PLoS Pathog. 2007 May 4;3(5):e62. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030062
8. Rose SJ, Bermudez LE. Identification of Bicarbonate as a Trigger and Genes Involved with Extracellular DNA Export in Mycobacterial Biofilms. mBio. 2016 Dec 6;7(6):e01597-16. DOI: 10.1128/mBio.01597-16
9. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998 Jun 11;393(6685):537-44. DOI: 10.1038/31159
10. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reyssset G, Garnier T, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res. 2007 Feb;17(2):192-200. DOI: 10.1101/gr.5942807
11. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PD, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the

evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res. 2008 May;18(5):729-41.

DOI: 10.1101/gr.075069.107

12. Fan X, Xie L, Li W, Xie J. Prophage-like elements present in *Mycobacterium* genomes. BMC Genomics. 2014 Mar 27;15(1):243. DOI: 10.1186/1471-2164-15-243
13. Wu J, Xi C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. Appl Environ Microbiol. 2009 Aug;75(16):5390-5. DOI: 10.1128/AEM.00400-09
14. Ghatak S, Muthukumar RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP analysis. J Biomol Tech. 2013 Dec;24(4):224-31. DOI: 10.7171/jbt.13-2404-001

Информация о соавторах:

Савицкая Анна Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Государственного научного центра Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН
ORCID: 000-0001-8519-020X

Хохлова Ольга Евгеньевна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, профессор факультета биологической безопасности ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» Пущинский государственный естественно-научный институт

Винник Юрий Семёнович, Заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Теплякова Ольга Валериевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого; врач-хирург Клинической больницы «РЖД-Медицина» г. Красноярск
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Information about co-authors:

Anna G. Savitskaya, PhD in Biological Sciences, Researcher, M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov State Research Center of the Russian Federation Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
ORCID: 000-0001-8519-020X

Olga E Khokhlova, PhD, DSc (Biological Sciences), Associate Professor, Chief Researcher of the Laboratory of Antimicrobial Drugs of the Department of Molecular Microbiology of the State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Professor of the Faculty of Biological Safety of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "ROSBIOTECH" PushchGENI

Yury S. Vinnik, Honored Scientist of the Russian Federation, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery of the Prof. V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Olga V. Teplyakova, MD, PhD, DSc, Professor of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, Prof. V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University; Surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" of the city of Krasnoyarsk
ORCID: 0000-0003-0005-3316

Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК

А.В.Ильинов^{1,2}, А.Г.Савицкая³, О.Е.Хохлова⁴, Ю.С.Винник¹, О.В.Теплякова^{1,2}

¹ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация;

²Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБУН ГНЦ Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация;

⁴ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Российская Федерация

Цель исследования. Изучить взаимодействие клеток медленно- и быстрорастущих штаммов микобактерий с чужеродной внеклеточной ДНК (вкДНК), оценить ее способность влиять на устойчивость клеток микобактерий к антимикробным препаратам.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы медленно- и быстрорастущих *Mycobacterium tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172, *Mycobacterium intracellulare* 13950 и быстрорастущих микобактерий *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841. Клетки микобактерий в начале экспоненциальной фазы роста, инкубировали с ДНК лосося на бульонных средах в течение 24 ч, отмывали и окрашивали оставшуюся на клетках вкДНК красителями SYTOX Green (SG) и CV-AM. Количество вкДНК оценивали методом проточной цитофлуориметрии. У штамма с наибольшим количественным изменением вкДНК определяли устойчивость к антибиотикам, механизм действия которых не предусматривает прямого взаимодействия с ДНК (амикацин и кларитромицин).

Результаты. Количество вкДНК у медленно- и быстрорастущих *M. tuberculosis* var. БЦЖ Токио 172 и *M. intracellulare* 13950 после инкубации с ДНК лосося не изменилось, в то время как у быстрорастущего штамма *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 оно увеличилось в 2,5 раза. Последующая инкубация *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* ATCC 6841 с антибиотиками в присутствии ДНК лосося показала, что концентрация ДНК лосося 310 нг/мл способствует увеличению устойчивости к амикацину, но не кларитромицину. Увеличение устойчивости к кларитромицину было выявлено только при концентрации ДНК лосося 3100 нг/мл и 10 мкг/мл кларитромицина.

Заключение. Быстрорастущие штаммы микобактерий более активно взаимодействуют с чужеродной вкДНК на начальных этапах роста (формирования биопленок), что способствует увеличению лекарственной устойчивости, в то время как медленно- и быстрорастущие штаммы практически не взаимодействуют с чужеродной ДНК на начальных этапах роста, что может быть связано с присутствием собственной вкДНК в необходимом количестве для данного этапа роста.

Ключевые слова: медленно- и быстрорастущие микобактерии, взаимодействие микобактерий, амикацин, кларитромицин, внеклеточная ДНК, биопленки

Для цитирования: Ильинов А.В., Савицкая А.Г., Хохлова О.Е., Винник Ю.С., Теплякова О.В. Способность медленно- и быстрорастущих штаммов бактерий рода *Mycobacterium* взаимодействовать с чужеродной внеклеточной ДНК. Бактериология. 2025; 10(3): 56–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-3-56-61

The ability of slow-growing and fast-growing strains of *Mycobacterium* to interact with foreign extracellular DNA (eDNA)

A.V.Ilinov^{1,2}, A.G.Savitskaya³, O.E.Khokhlova⁴, Yu.S.Vinnik¹, O.V.Teplyakova^{1,2}

Для корреспонденции:

Ильинов Александр Владимирович, врач-хирург, Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Красноярск; старший преподаватель кафедры общей хирургии им. проф. М.И.Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого

Адрес: 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1
ORCID: 0000-0002-8247-1388

Статья поступила 10.04.2025, принята к печати 30.09.2025

For correspondence:

Aleksandr V. Ilinov, surgeon, Clinical Hospital "RZhD-Medicine" in Krasnoyarsk, senior lecturer of the Professor M.I.Gulman Department of General Surgery, V.F.Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University

Address: 1 Partizan Zheleznyak str., Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation
ORCID: 0000-0002-8247-1388

The article was received 10.04.2025, accepted for publication 30.09.2025