

УДК 579.61

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ТРАНСФОРМАЦИИ *Mycobacterium abscessus* МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОПОРАЦИИ

© 2025 г. Е. В. Захарьева¹, Б. А. Мартини¹, Е. Г. Салина^{1, *}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: elenasalina@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.04.2025 г.

После доработки 26.04.2025 г.

Принята к публикации 28.04.2025 г.

Эффективная трансформация микобактерий и, в частности, *Mycobacterium abscessus*, значительно осложняется специфическим строением их клеточной стенки. Наиболее широко используемым и эффективным методом введения молекул плазмидной и фаговой ДНК в клетки микобактерий является электропорация. На эффективность электропорации существенное влияние оказывают многие факторы, такие как природа ДНК, селективный маркер, добавки в питательную среду, параметры электрического импульса, вид и штамм микобактерии-реципиента. Хотя условия эффективной электропорации для медленно растущего патогена *Mycobacterium tuberculosis* и быстрорастущего сапрофита *Mycobacterium smegmatis* подробно описаны в литературе, рекомендации относительно *M. abscessus* носят разрозненный и даже противоречивый характер. В настоящей работе установлено, что эффективная трансформация *M. abscessus* ATCC 19977 репликативным вектором pMV261 методом электропорации возможна при использовании культуры в логарифмической фазе роста в достаточно широком диапазоне значений оптической плотности $OP_{600} = 0.8–4.2$, при этом охлаждение несущественно влияло на частоту трансформации. Критически важным параметром была масса вносимой ДНК. Установлено, что число полученных трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК возрастало пропорционально квадрату ее массы, при внесении менее 0.5 мкг плазмидной ДНК эффективность электропорации была недостаточной.

Ключевые слова: *Mycobacterium abscessus*, нетуберкулезные микобактерии, трансформация, электропорация, вектор pMV261

DOI: 10.7868/S3034574X25050059

Бактерии рода *Mycobacterium* широко распространены в водной и наземной средах обитания, большинство его представителей не вызывают заболеваний у человека и животных, являясь сапрофитами и условными патогенами. Исключение составляет немногочисленная группа патогенных микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК), вызывающих туберкулез у человека и животных, в первую очередь *Mycobacterium tuberculosis*, и возбудитель проказы *Mycobacterium leprae*. Все остальные микобактерии образуют обширную группу нетуберкулезных микобактерий (НТМ), то есть не вызывающих туберкулез у человека и животных, которая включает в себя около 200 видов. В последние годы число людей, инфицированных НТМ, неуклонно растет. Наиболее часто выяв-

ляемыми микобактериями среди быстрорастущих НТМ являются бактерии комплекса **MABSC** (англ. *Mycobacterium abscessus* complex), относящиеся к группе условных патогенов [1–4]. В большинстве случаев (свыше 80%) инфекции НТМ проявляются как легочные заболевания [5]. НТМ в большом количестве встречаются в таких экологических нишах, как почва, сточные воды, разлагающаяся растительность, а также источники питьевой воды [6–8], что обеспечивает высокую частоту их контактов с человеком. Увеличение среднего возраста населения во всем мире, сопутствующие заболевания легких, в частности, муковисцидоз и бронхоэктазы, а также иммуносупрессионная терапия способствуют росту числа инфекций НТМ [9]. Наиболее часто в клинических изолятах среди бактерий комплек-

са MABSC детектируется *M. abscessus*, несколько реже *M. massiliense* и *M. bolletii* [10], причем доля каждого из этих подвидов может варьировать в зависимости от региона [11]. Хотя представители MABSC до сих пор принято считать условно-патогенными микроорганизмами, сегодня накопилось достаточно много экспериментальных данных, позволяющих рассматривать данный вид как активно эволюционирующий в истинный патоген [2]. Помимо иммунокомпromетированных, *M. abscessus* способен поражать и иммунокомпетентных людей без хронических заболеваний легких [12]. Сообщается, что доля инфекций *M. abscessus* среди здоровых людей также растет [13]. Беспокойство вызывает и тот факт, что в последнее время появляются данные о возможной передаче *M. abscessus* от человека к человеку, а не только из окружающей среды, как считалось ранее [14]. Существует вероятность того, что на самом деле число легочных инфекций *M. abscessus* во всем мире гораздо выше, чем свидетельствуют официальные данные, поскольку многие случаи ошибочно диагностируются как инфекции, вызванные *M. tuberculosis* из-за сходства симптомов заболевания и морфологии клеток при микроскопическом исследовании мазков мокроты, что приводит к некорректной антибактериальной терапии [15, 16]. Основная угроза *M. abscessus* как патогена человека обусловлена его лекарственной устойчивостью к большинству известных антибиотиков [12], что существенно влияет на эффективность лечения и продолжительность курса антибиотикотерапии [17].

Геном *M. abscessus* был полностью секвенирован (GenBank accession number NC 010397) [18], что открыло для исследователей возможность изучения генетически обусловленных механизмов лекарственной устойчивости и стратегий вирулентности данной бактерии при инфекции макроорганизма посредством стандартных молекулярно-генетических подходов. Для решения этих задач необходимо проведение соответствующих манипуляций с клетками микобактерий, таких как выделение и очистка нуклеиновых кислот, получение мутантных штаммов, мутагенез и др. Высокоэффективная трансформация ДНК является неотъемлемой частью работы с бактериальными клетками, но у микобактерий она существенно осложняется специфическим строением клеточной стенки, содержащей множество гидрофобных слоев с низкой проницаемостью [19, 20]. Наиболее широко используемым и эффективным методом введения молекул ДНК в штаммы микобактерий является электропорация, в процессе которой клетки подвергаются кратковременному высоковольтному электрическому импульсу, который позволяет молекулам экзогенной ДНК проникать в бактериальную клетку через поры, возникающие в мембране и клеточной стенке [19, 20]. Электропорация используется для

введения в клетки плазмидной и фаговой ДНК, а также олигонуклеотидов. На ее эффективность влияют многие факторы: природа рекомбинантной ДНК, селективный маркер, добавки в питательную среду, параметры электрического импульса, вид и даже штамм микобактерии-реципиента [21]. Условия эффективной электротрансформации для медленно растущего патогена *M. tuberculosis* и быстро растущего сапрофита *M. smegmatis* подробно описаны в 4-ом издании руководства “Микобактериальные протоколы”, однако четкий протокол электропорации для вида *M. abscessus* в нем отсутствует [20]. В литературе встречаются рекомендации по трансформации *M. abscessus*, однако они достаточно разрозненны и иногда противоречивы [21, 22].

Цель работы – найти оптимальные условия для эффективной трансформации клеток *M. abscessus* плазмидной ДНК методом электропорации.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования.

Клетки бактерии *M. abscessus* ATCC 19977, полученные из исследовательского университета “Европейская политехническая школа Лозанны” (Лозанна, Швейцария), хранили в низкотемпературном морозильнике при -70°C . Клетки первоначально выращивали в синтетической среде Миддлбука (7Н9 “Himedia” (Индия) с добавлением 10% об./об. ростовой добавки ADS (г/л; БСА – 50, глюкоза – 2, хлорид натрия – 8,5) и 0.05% об./об. Твин-80 – 0.085 “Neofroxx GmbH” (Германия) при 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 3 сут. Полученную культуру пересевали в свежую среду аналогичного состава (доза инокулята 0.01–0.1% об./об.) и выращивали до фазы логарифмического роста, в некоторых случаях – до ранней стационарной фазы.

Подсчет количества клеток. Из суспензии бактериальных клеток готовили серию последовательных десятикратных разведений в свежей среде для выращивания, затем аликвоту каждого разведения высевали на агаризованную (1.5% агара) синтетическую питательную среду 7Н9 с добавлением 10% ростовой добавки ADS. Инокулированные чашки инкубировали при 37°C . Число колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. abscessus* подсчитывали через 5–6 сут после посева, рассчитывая среднее из 3 повторностей.

Приготовление компетентных клеток для электропорации. Культуру клеток логарифмической или стационарной фазы роста (≈ 100 мл) осаждали на центрифуге “Eppendorf” (Германия) при 4000 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученный осадок ресуспендировали в 10%-ном стерильном растворе глицерина и далее трижды отмывали этим раствором, центрифугуя при 4000 об./мин в течение 10 мин при комнатной

температуре сначала объемом, равным объему исходной культуры (100 мл), затем снижая его в 2 раза в каждом следующем этапе отмывки. Полученные компетентные клетки ресуспендировали в 1 мл 10%-ного стерильного раствора глицерина.

Электропорация бактериальных клеток. 400 мкл полученной суспензии компетентных клеток отбирали, осторожно перемешивали пипетированием с аликвотой раствора плазмидной ДНК в воде и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем суспензию переносили в кювету для электропорации “BioRad” (США) с расстоянием между электродами 2 мм и подавали импульс на электропораторе Gene Pulser “BioRad” (США). Параметры импульса: $C = 25$ мкФ, $V = 2500$ В, $R = 1000$ Ом в экспоненциальном режиме.

Отбор целевых клонов-трансформантов. После импульса культуру ресуспендировали в 3.6 мл среды 7Н9 с добавлением ADS и Твин-80 и инкубировали при 37°C с перемешиванием (200 об./мин) в течение 18–24 ч. Далее готовили серию десятикратных последовательных разведений, аликвоту каждого разведения высевали на агаризованную (1.5% агара) синтетическую питательную среду 7Н9 с добавлением ADS и 200 мкг/мл канамицина “CDH” (Индия). Инокулированные чашки инкубировали при 37°C. КОЕ *M. abscessus* подсчитывали через 5–6 сут после посева, рассчитывая среднее из 3 повторностей.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили с использованием программы Excel 2016 MSO (16.0.4639.1000). Результаты, представленные как среднее значение \pm стандартное отклонение, анализировали с использованием непарного t-критерия Стьюдента; значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность трансформации клеток *M. abscessus* плазмидной ДНК методом электропорации исследовали на примере репликативного мультикопийного внехромосомного вектора pMV261, содержащего кассету, кодирующую устойчивость к канамицину (ген *aph*, полученный из Tn903), точку начала репликации *E. coli* (*oriE*), точку начала репликации плазмидной ДНК микобактерий (*oriM*) и кассету экспрессии, содержащую микобактериальный промотор, сайты клонирования и терминатор транскрипции [23]. После применения имеющихся методик электропорации клеток медленно растущего вида *M. tuberculosis* и быстро растущего вида *M. smegmatis* [20] для культуры *M. abscessus* было обнаружено, что эффективность трансформации клеток данного вида оказалась неудовлетворительной, следовательно, была необходима оптимизация существующих протоколов.

Влияние массы плазмидной ДНК. Как известно, эффективность трансформации электропорацией

M. tuberculosis и других МБТК слабо зависит от количества внесенной ДНК, добавление плазмидной ДНК в количестве 0.5–500 нг приводит к достаточно высокой и стабильной эффективности трансформации электропорацией с получением 10^4 – 10^6 трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК, которая несущественно изменяется при дальнейшем увеличении массы вносимой ДНК до 5000 нг [20].

Однако при трансформации клеток *M. abscessus* в логарифмической фазе роста плазмидой pMV261 с массой ДНК в интервале от 5 до 50 нг удавалось получить крайне малое число трансформантов. Эффективность трансформации составляла не более 30 трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК, а частота трансформации, определяемая как количество трансформантов на 10^6 трансформированных бактерий, составляла менее 0.001.

При внесении ДНК в диапазоне массы 100–250 нг частота получения трансформантов при электропорации *M. abscessus* была также достаточно низкой и составляла около 0.01, а эффективность трансформации не превышала 500 трансформантов на 1 мкг ДНК, что было в сотни и даже тысячи раз меньше, чем эффективность трансформации *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* в тех же условиях [24, 25].

Увеличение массы вносимой плазмидной ДНК до 0.5 мкг позволило получать достаточное количество трансформантов *M. abscessus* ($\approx 2 \times 10^3$). Дальнейшее увеличение массы вносимой ДНК до 1.5 мкг и затем до 5 мкг приводило к нелинейному возрастанию числа трансформантов. Эффективность трансформации, выраженная в количестве полученных трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК, была пропорциональна квадрату массы внесенной плазмиды и описывалась уравнением:

$$N = km^2,$$

где N – число трансформантов, m – масса плазмидной ДНК (мкг), k – коэффициент (≈ 7500) (рис. 1). Следует отметить, что исследование эффективности трансформации медленно растущей условно-патогенной бактерии *M. avium* электропорацией показало, что при увеличении массы плазмидной ДНК с 1.5 до 3 мкг наблюдалось ступенчатое увеличение эффективности трансформации более чем в 700 раз, а дальнейшее увеличение массы ДНК до 6 мкг приводило к росту эффективности еще в 6.4 раза [20, 26].

Поскольку плаزمида pMV261 содержит ген устойчивости к канамицину, в качестве селективного маркера для отбора целевых клонов на плотной среде был использован этот антибиотик в концентрации 100–250 мкг/мл. Указанная концентрация канамицина выше, чем рекомендованная для селекции трансформантов *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* – 10–50 мкг/мл [20], но поскольку *M. abscessus* является полирезистентной бактерией, устойчивой в том числе и к аминогликозидам [27],

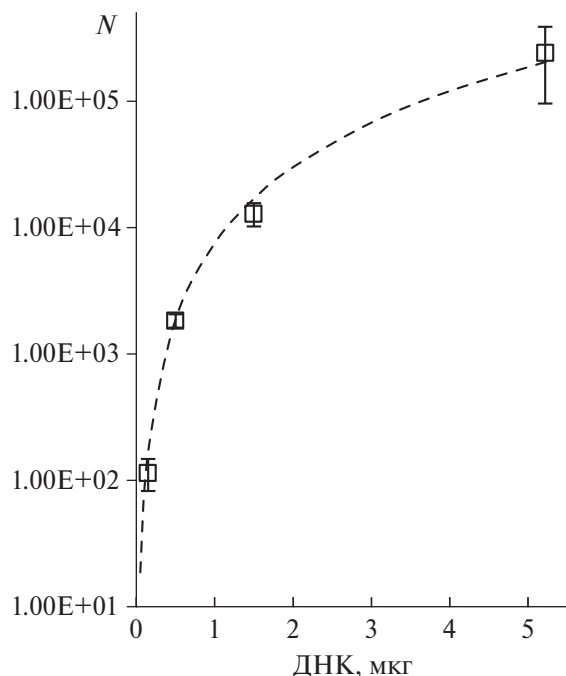


Рис. 1. Зависимость эффективности трансформации (N), выраженной как количество полученных трансформантов в расчете на мкг ДНК, от массы внесенной плазмидной ДНК ($k \approx 7500$).

для селекции целевых клонов рекомендуется использовать повышенную (до 250 мкг/мл) концентрацию канамицина [28, 29], хотя концентрация 50 мкг/мл для отбора целевых клонов на плотной среде также используется [22]. Было обнаружено, что концентрация канамицина в пределах 100–250 мкг/мл существенно не влияла на число полученных целевых клонов, поэтому в дальнейшем для селекции трансформантов на плотной питательной среде использовали концентрацию 200 мкг/мл.

Влияние фазы роста. В целом для успешной электропорации рекомендуется использовать культуру активно делящихся микобактерий в логарифмической фазе роста, когда проницаемость их клеточной стенки максимальна. Для *M. smegmatis* рекомендуемая для электропорации оптическая плотность культуры OD_{600} составляла от 0.8 до 1.0, хотя для *M. tuberculosis* возможно использование культуры в логарифмической фазе роста в более широком диапазоне оптической плотности [20]. При этом сообщается, что для *M. avium* частота трансформации максимальна лишь в ранней логарифмической фазе роста $OD_{600} \leq 0.65$ [26].

Изучено влияние фазы роста *M. abscessus* на эффективность электротрансформации. Для этого была проведена электропорация культур, взятых в логарифмической фазе и в начале стационарной фазы роста (рис. 2). Во всех экспериментах масса внесенной плазмидной ДНК составляла 1.5 мкг. Для трансформации использовали культуры с оп-

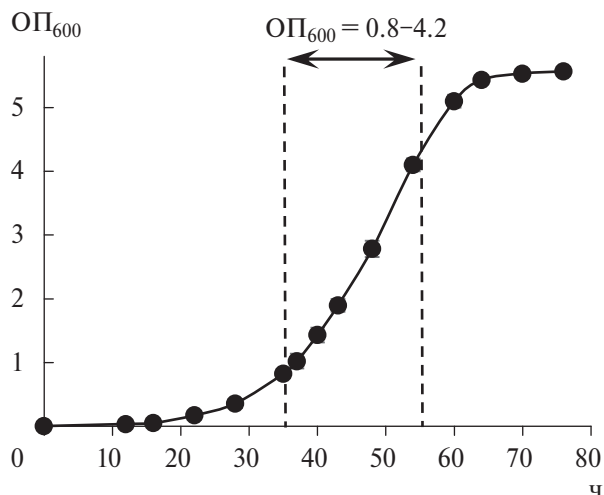


Рис. 2. Кривая роста *M. abscessus*. Стрелкой обозначен диапазон OP_{600} культуры, при которых частота трансформации F составляла от 0.5 до 2.0 в расчете на 10^6 трансформированных бактерий.

тической плотностью $OD_{600} \geq 0.8$, поскольку при более низких значениях OD_{600} объем получаемой биомассы был недостаточен для проведения электропорации.

В логарифмической фазе роста эффективность трансформации слабо менялась с ростом оптической плотности культуры, однако при переходе в стационарную фазу роста следовало предсказуемое достаточно резкое снижение эффективности (табл. 1). Таким образом, для эффективной электропорации допустимо использовать культуру в логарифмической фазе роста в достаточно широком диапазоне оптической плотности OP_{600} от 0.8 до 4.2 (рис. 2).

Влияние температуры. Считается, что все манипуляции, связанные с электропорацией быстро-

Таблица 1. Зависимость частоты трансформации *M. abscessus*, определяемой как количество трансформантов на 10^6 трансформированных бактерий (F), от оптической плотности культуры

OP_{600}	Частота трансформации, F	Стандартное отклонение, $\pm f$
0.84	1.775	0.373
0.92	1.196	0.719
1.11	0.849	0.176
2.16	0.877	0.498
4.20	0.489	0.269
5.10	0.052	0.022
5.40	0.021	0.010

растущих микобактерий, необходимо проводить при охлаждении, дополнительно включая шаг предохлаждения культуры во льду в течение 1.5–2 ч перед началом приготовления компетентных клеток [20]. При этом известно, что для медленно растущих микобактерий охлаждение при электропорации не является обязательным, более того, при наличии возможности для *M. tuberculosis* рекомендуется проведение всех манипуляций при температуре 37°C [20, 30]. Была проведена подготовка компетентных клеток и электропорация быстрорастущей *M. abscessus* при охлаждении (масса внесенной плазмидной ДНК 1.5 мкг), включая предохлаждение культуры во льду в течение 1.5 ч, использование холодного раствора стерильного 10%-ного глицерина для серии отмывок и последующего центрифугирования бактериальной суспензии при 4°C, а также использование охлажденных во льду кювет для электропорации. Эффективность трансформации, проведенной в данных условиях, сравнивали с эффективностью электропорации, проведенной полностью при комнатной температуре (масса внесенной плазмидной ДНК 1.5 мкг) (рис. 3, кривые 1 и 3). Оказалось, что эффективность электропорации при комнатной температуре и при охлаждении достоверно не различалась и в обоих случаях составляла около $1.1–1.2 \times 10^4$ в расчете на 1 мкг плазмидной ДНК. Поэтому в дальнейшем для упрощения экспериментальных процедур все манипуляции, связанные с подготовкой компетентных клеток, и непосредственно электропорацию *M. abscessus* проводили без охлаждения. Более того, недавно было обнаружено,

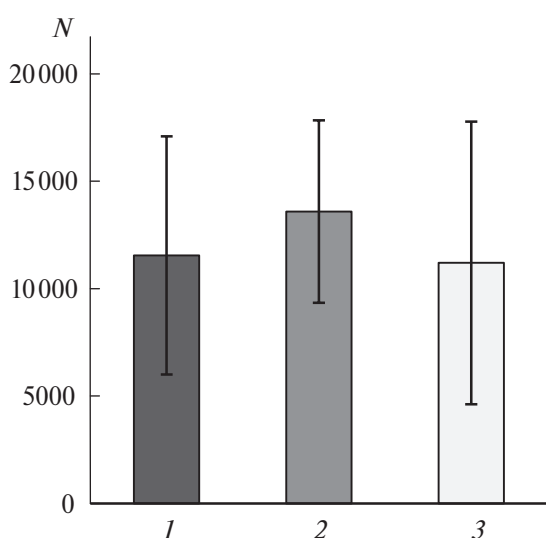


Рис. 3. Зависимость эффективности трансформации N , выраженной как количество полученных трансформантов на мкг ДНК, от условий электропорации: без охлаждения, инкубация после импульса 22 ч (1), без охлаждения, инкубация после импульса 5.5 ч (2) и с охлаждением, инкубация после импульса 22 ч (3).

что предынкубация культуры *M. abscessus* при 42°C положительно сказывается на эффективности электропорации, поскольку позволяет ингибировать экзогенные системы рестрикции-модификации ДНК, которые могут помешать процедуре трансформации [21]. При исследовании влияния температуры на эффективность трансформации *M. avium* (4°C, комнатная температура $\approx 22^\circ\text{C}$ и 37°C) наблюдалось небольшое (в 2–3 раза) увеличение частоты трансформации с ростом температуры раствора для отмывки клеток с 4 до 37°C, но использование нагретых до температуры 37°C кювет для электропорации не давало никаких преимуществ [26].

Влияние времени адаптации клеток после электрического импульса. Непосредственно после подачи электрического импульса рекомендуется разбавить клетки свежей питательной средой не менее чем в 10 раз, после чего инкубировать их в течение нескольких часов на качалке при 37°C перед посевом на плотные питательные среды. Этот шаг способствует восстановлению клеток после импульса и обеспечивает их лучшее выживание, тогда как пропуск этого шага приводит к значительному снижению эффективности электропорации [20, 31]. Быстрорастущие *M. smegmatis* рекомендуется высевать через 2–3 ч инкубации на качалке, что соответствует времени генерации τ ; соответственно медленно растущие *M. tuberculosis* следует инкубировать перед посевом до 16 ч. Поскольку время генерации *M. abscessus* составляет около 5.5 ч, после подачи импульса и последующего разбавления свежей питательной средой необходима предынкубация клеток перед посевом на плотные питательные среды в течение как минимум этого времени. Однако ввиду достаточно длительной подготовки компетентных клеток (около 2 ч), времени проведения самого процесса электропорации последующим разбавлением клеток свежей средой после импульса и инкубацией на качалке в течение 5–6 ч перед посевом на чашки — осуществление всех этапов трансформации в течение одного рабочего дня становится затруднительным. Было изучено, как влияет увеличение времени инкубации клеток на качалке перед посевом на плотные питательные среды после электрического импульса и разбавления их свежей питательной средой с 5.5 (соответствовало примерно 1 τ генерации) до 22 ч ($\approx 4 \tau$ генерации). Оказалось, что длительность инкубации не влияла на эффективность трансформации, которая составляла в обоих случаях $1.1–1.2 \times 10^4$ в расчете на 1 мкг ДНК (масса внесенной плазмидной ДНК — 1.5 мкг), при этом разница не была статистически достоверной (рис. 3)

Влияние объема раствора ДНК. Известно, что для небольших объемов суспензий компетентных клеток, используемых при электропорации (200–400 мкл), добавление водного раствора ДНК существенно влияло на проводимость суспензии

и, следовательно, эффективность трансформации. Так, рекомендуется вносить не более 5 мкл раствора ДНК, что составляет 1.25–2.5% от объема клеточной суспензии [20]. Нами было проведено сравнение эффективности трансформации *M. abscessus* при внесении в суспензию компетентных клеток объемом 400 мкл плазмидной ДНК одинаковой массы (1.5 мкг), растворенной в разных объемах воды (3 и 15 мкл). То есть объем раствора внесенной плазмидной ДНК составил, соответственно, 0.75 и 3.75% от объема бактериальной суспензии. В результате было обнаружено, что эффективность трансформации при увеличении объема плазмидной ДНК в 5 раз снизилась на 35%, с 1.2×10^4 до 7.7×10^3 трансформантов в расчете на 1 мкг ДНК, при том что масса внесенной ДНК в обоих случаях была одинаковой.

Таким образом, установлено, что эффективная трансформация *M. abscessus* репликативным вектором методом электропорации возможна при использовании культуры в логарифмической фазе роста в достаточно широком диапазоне значений оптической плотности – от 0.8 до 4.2 при длине волны 600 нм. Критически важным параметром была масса вносимой плазмидной ДНК: число трансформантов в расчете на 1 мкг плазмиды возрастало пропорционально квадрату ее массы. Оптимальным для эффективной электропорации является масса репликативного вектора 0.5–1.5 мкг; при внесении менее 0.5 мкг плазмидной ДНК эффективность электропорации недостаточна. Полученные результаты могут быть использованы для создания мутантных штаммов *M. abscessus* с целью изучения механизмов вирулентности данной бактерии.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа частично поддержана Российским научным фондом, грант № 23-15-00173 (“Получение мутантных штаммов *M. abscessus* с гиперэкспрессией потенциальных факторов вирулентности”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Degiacomi G., Sammartino J.C., Chiarelli L.R., Ribabova O., Makarov V., Pasca M.R. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 23. P. 5868. <https://doi.org/10.3390/ijms20235868>
2. To K., Cao R., Yegiazaryan A., Owens J., Venketaraman V. // J. Clin. Med. 2020. V. 9. № 8. P. 2541. <https://doi.org/10.3390/jcm9082541>
3. Honda J.R., Viridi R., Chan E.D. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029>
4. Schiff H.F., Jones S., Achaiah A., Pereira A., Stait G., Green B. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1730. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37350-8>
5. Griffith D.E., Aksamit T., Brown-Elliott B.A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007. V. 175. № 4. P. 367–416. <https://doi.org/10.1164/rccm.200604-571ST>
6. Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. // Clin. Microbiol. Rev. 2002. V. 15. № 4. P. 716–746. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.716-746.2002>
7. Falkinham J.O. // Clin. Chest Med. 2015. V. 36. № 1. P. 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.10.003>
8. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van't Riet K. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 6. P. 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>
9. Johansen M.D., Herrmann J.L., Kremer L. // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. № 7. P. 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>
10. Koh W.J., Stout J.E., Yew W.W. // Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2014. V. 18. № 10. P. 1141–1148. <https://doi.org/10.5588/ijtld.14.0134>
11. Koh W.J., Jeon K., Lee N.Y., Kim B.J., Kook Y.H., Lee S.H. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011. V. 183. № 3. P. 405–410. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0395OC>
12. Lopeman R.C., Harrison J., Desai M., Cox J.A. // Microorganisms. 2019. V. 7. № 3. P. 90. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030090>
13. Gopalswamy R., Shanmugam S., Mondal R., Subbian S. // J. Biomed. Sci. 2020. V. 27. № 1. P. 74. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00667-6>
14. Bryant J.M., Grogono D.M., Rodriguez-Rincon D., Everall I., Brown K.P., Moreno P. et al. // Science. 2016. V. 354. № 6313. P. 751–757. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8156>
15. Brown-Elliott B.A., Nash K.A., Wallace R.J. // Clin. Microbiol. Rev. 2012. V. 25. № 3. P. 545–582. <https://doi.org/10.1128/CMR.05030-11>
16. Sharma S.K., Upadhyay V. // Indian J. Med. Res. 2020. V. 152. № 3. P. 185–226. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_902_20
17. Chen J., Zhao L., Mao Y., Ye M., Guo Q., Zhang Y. et al. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1977. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01977>
18. Ripoll F., Pasek S., Schenowitz C., Dossat C., Barbe V., Rottman M. et al. // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. P. e5660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005660>

19. Jacobs W.R., Kalpana G.V., Cirillo J.D., Pascopella L., Snapper S.B., Udani R.A. et al. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 204. P. 537–555.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04027-L](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04027-L)
20. *Mycobacteria Protocols* / Eds. T.Parish, A. Kumar N.Y.: Humana Press, 2021. 736 p.
21. Campo-Pérez V., Cendra M.D.M., Julián E., Torrents E. // *N. Biotechnol.* 2021. V. 63. P. 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.02.003>
22. Medjahed H., Singh A.K. Genetic Manipulation of *Mycobacterium abscessus*. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2010. V. 18. № 1. P. 10D-2.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc10d02s18>
23. Stover C.K., de la Cruz V.F., Fuerst T.R., Burlein J.E., Benson L.A., Bennett L.T. et al. // *Nature.* 1991. V. 351. № 6326. P. 456–460.
<https://doi.org/10.1038/351456a0>
24. Kalpana G. V., Bloom B. R., Jacobs W. R. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991. V. 88. № 12. P. 5433–5437.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5433>
25. Snapper S.B., Melton R.E., Mustafa S., Kieser T., Jacobs W.R. Jr // *Mol. Microbiol.* 1990. V. 4. № 11. P. 1911–1919.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x>
26. Lee S.H., Cheung M., Irani V., Carroll J.D., Inamine J.M., Howe W.R. et al. // *Tuberculosis.* 2002. V. 82. № 4–5. P. 167–174.
<https://doi.org/10.1054/tube.2002.0335>
27. Rominski A., Selchow P., Becker K., Brülle J.K., Dal Molin M., Sander P. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2017. V. 72. № 8. P. 2191–2200.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx125>
28. Akusobi C., BENGHOMARI B.S., Zhu J., Wolf I.D., Singhvi S., Dulberger C. L. et al. // *Elife.* 2022. V. 11. P. e71947.
<https://doi.org/10.7554/eLife.71947>
29. Viljoen A., Gutiérrez A.V., Dupont C., Ghigo E., Kremer L. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018. V. 8. P. 69.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00069>
30. Wards B.J., Collins D.M. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. V. 145. № 1. P. 101–105.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08563.x>
31. David M., Lubinsky-Mink S., Ben-Zvi A., Ulitzur S., Khun J., Suissa M. // *Plasmid.* 1992. V. 28. № 3. P. 267–271.
[https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90059-J](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90059-J)

Optimization of Transformation Conditions by Electroporation for *Mycobacterium abscessus*

E. V. Zakhariyeva^a, B. A. Martini^a, and E. G. Salina^{a,*}

^a*Bach Institute of Biochemistry, the Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: elenasalina@yandex.ru*

Efficient transformation of mycobacteria, in particular *M. abscessus*, is significantly complicated by the specific structure of their cell wall. The most widely used and effective method of introducing plasmid and phage DNA into mycobacterial cells is electroporation. The efficiency of electroporation is significantly affected by many factors, such as the nature of the DNA, the selective marker, growth supplements, the parameters of the electrical impulse, the species and the strain of the recipient mycobacterium. Although conditions for efficient electroporation for the slow-growing pathogen *M. tuberculosis* and the fast-growing saprophyte *M. smegmatis* have been described in details, recommendations for *M. abscessus* are scattered and even contradictory. Here it was established that efficient transformation of *M. abscessus* ATCC 19977 with the replicative vector pMV261 by electroporation is possible when using a logarithmic growth phase culture in a fairly wide range of optical density values $OD_{600} = 0.8–4.2$, while cooling has little effect on the transformation frequency. A critical parameter is the mass of the introduced DNA. It has been established that the number of transformants obtained per 1 μ g of DNA increases proportionally to the square of its mass. In case of introducing less than 0.5 μ g of plasmid DNA the efficiency of electroporation is insufficient.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*, non-tuberculosis mycobacteria, transformation, electroporation, pMV261