

А.Ю. МИРЮТА, Т.П. ПЕРЕРВА,
Л.П. МОЖИЛЕВСКАЯ, В.А. КУНАХ

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного 150, Киев, 03143, Украина
E-mail: kunakh@imbg.org.ua

**ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА
КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК
UNGERNIA VICTORIS И КАТИОНОВ
НЕКОТОРЫХ МЕТАЛЛОВ
НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ТРАНСФОРМАЦИИ
КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI*
ПЛАЗМИДНОЙ ДНК**



В системе трансформации клеток E.coli, обработанных CaCl₂, с использованием ДНК плазмиды pBR322 изучено влияние экстракта из биомассы культивируемых in vitro клеток U. victoris на связь между выходом трансформантов, выживанием клеток и изменением конформации плазмидной ДНК. Полученные данные сравнивали с влиянием некоторых солей одно- и двухвалентных металлов на эти же параметры. Показано наличие различных механизмов колебаний выживаемости клеточной популяции и выхода трансформантов в зависимости от использования солей или растительного экстракта.

© А.Ю. МИРЮТА, Т.П. ПЕРЕРВА, Л.П. МОЖИЛЕВСКАЯ,
В.А. КУНАХ, 2005

Введение. В основе механизма трансформации *E. coli* плазмидной ДНК лежит переход бактериальной клетки в так называемое состояние компетентности, обеспечивающее проникновение ДНК через клеточную стенку внутрь бактерии. Методика получения компетентных клеток и последующей их трансформации плазмидой включает в себя использование ионов Ca²⁺ и теплового шока при 42 °С [1]. В результате такой обработки фосфолипидный слой оболочки бактерии претерпевает изменения, именуемые фазовым переходом, за счет чего и достигается временная проницаемость клеточной стенки [2, 3]. Считается, что во время фазового перехода образуются разрывы в упаковке липидов на границах геле- и жидкокристаллических доменов мембраны и, возможно, на границах липидов и агрегированных мембранных белков [4]. Эти разрывы представляются наиболее вероятными кандидатами на роль каналов для прохождения ДНК через мембрану. Показана также строгая корреляция между эффективностью трансформации и образованием поли-β-гидроксibuтират/кальций полифосфатных комплексов в плазматических мембранах [5, 6]. Предполагается, что эти комплексы образуют каналы или дефекты в двойном липидном слое и тем самым способствуют переносу нуклеиновых кислот [7].

Таким образом, приобретение клеткой состояния компетентности связано с существенными повреждениями мембран оболочки и, соответственно, нарушением ее целостности. В связи с этим компетентные клетки можно рассматривать как экспериментальную систему, вполне пригодную для изучения биологического (протекторного) воздействия, направленного на поверхностные структуры клетки со стороны веществ самого различного происхождения (в нашем случае экстрактов из биомассы культивируемых *in vitro* клеток лекарственных растений).

В предшествующей работе [8] нами было показано, что экстракты из биомассы культивируемых *in vitro* клеток лекарственных растений *Ungernia victoris*, *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea* (культивированной и натуральной), внесенные в трансформационную смесь за 30 мин до термошока, резко снижают (до 2–4 % от контроля) выход трансформантов, получаемых при обработке компетентных клеток *E. coli* HB 101

плазмидой pBR322. Экстракт *Polyscias filicifolia* оказался менее эффективным в этом отношении. В его присутствии выход трансформантов снижался лишь до 70 %.

Биологический эффект экстракта *U. victoris* был изучен более подробно: показано, что в его присутствии происходит не только снижение эффективности трансформации, но и повышение жизнеспособности клеток, подвергшихся жесткой обработке в процессе приведения их в состояние компетентности. На основании полученных данных нами был сделан предварительный вывод о наличии протекторных свойств у экстрактов из биомассы некоторых культивируемых лекарственных растений, проявляющихся на фоне поврежденных бактериальных мембран. Однако не исследована связь протекторного влияния растительных экстрактов с изменениями конформационного состояния трансформирующей ДНК и выживаемостью клеточной популяции, подвергнутой обработке для получения компетентных клеток.

В настоящей работе изучали влияние экстракта из биомассы культивируемых клеток *U. victoris* на три параметра: выход трансформантов, выживаемость CaCl_2 -обработанных клеток и изменение конформации плазмидной ДНК. Полученные данные сравнивали с влиянием некоторых солей одно- и двухвалентных металлов на эти же параметры, что позволило установить наличие различных механизмов колебаний одних и тех же биологических показателей, а именно выживаемости клеточной популяции и выхода трансформантов при использовании солей или экстрактов из растительных клеток.

Материалы и методы. Бактерии. В работе использованы штамм *E. coli* НВ 101 и плазида pBR322, полученные из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН (Пушино, РФ).

Питательные среды и реактивы. Бактериальную культуру выращивали на полноценной среде Лурия-Бертани (LB-среда) [9]. Концентрации антибиотиков ампициллина и тетрациклина в среде составляли 50 и 12,5 мкг/мл соответственно. Использовали также агаризованную (1,7 %) питательную LB-среду.

Условия выращивания бактериальной культуры. Бактерии выращивали на агаризованной

LB-среде при температуре 37 °С. Ночные культуры использовали для инокуляции в жидкую LB-среду с последующим культивированием на качалке (37 °С до достижения культурой середины логарифмической стадии роста при оптической плотности (ОП_{550}), равной 0,3). Оптическую плотность бактериальной суспензии определяли при помощи фотометра КФК-3 (произведенного в СССР).

Получение компетентных клеток, выделение плазмидной ДНК и электрофорез в агарозном геле производили соответственно стандартным методом по [10].

Растительный экстракт. Исследовали активность 40%-ного этанольного экстракта, полученного из биомассы культивируемых клеток стандартным методом перколяции. Конечное соотношение спирт—биомасса составляло 10 : 1. Источником биомассы служила культура тканей унгернии Виктора *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный № 10, ККК ИМБиг НАН Украины, Киев) — далее экстракт *U. victoris*. Экстракт упаривали при помощи вакуумно-ротационного испарителя при температуре 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до исходного объема экстракта.

Активность экстракта определяли по изменению конечного выхода трансформантов и общего выживания клеток в варианте с экстрактом по сравнению с контролем. Экстракты вносили в инкубационную смесь до конечной концентрации 5 % (по объему). Выход трансформантов определяли высеванием проб на агаризованную LB-среду с антибиотиками, общую выживаемость бактериальных клеток — высеванием проб на агаризованную LB-среду без антибиотиков. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Содержание суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК определяли с помощью программы «Scion Image» [<http://www.scioncorp.com>].

Результаты исследований и их обсуждение. Первая серия опытов была направлена на изучение динамики выживаемости клеток и доли суперскрученной ДНК в присутствии различных концентраций CaCl_2 , а также возможной

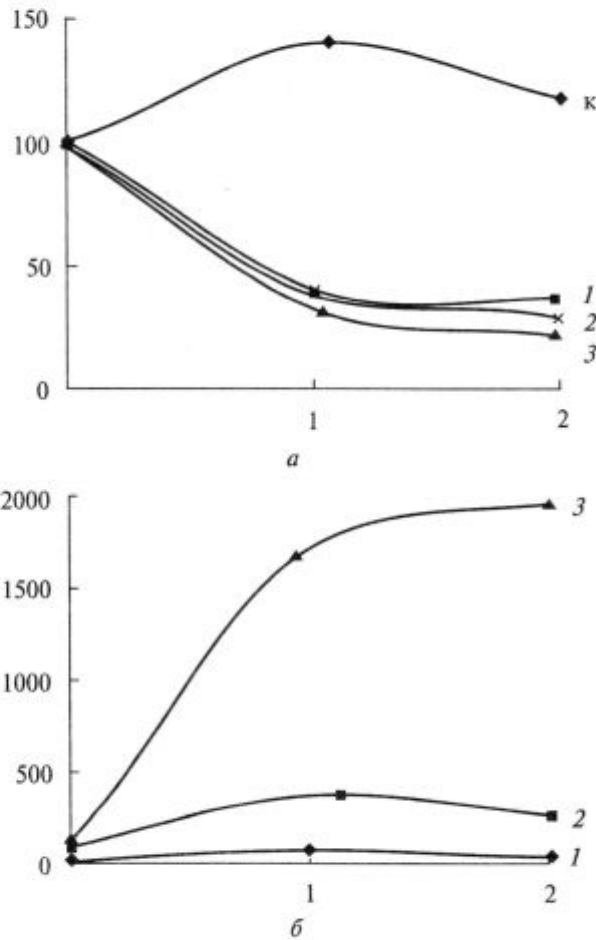


Рис. 1. Динамика выживаемости клеток (*a*) (по вертикали — %) и выхода трансформантов (*б*) (по вертикали — колонии/мл) в зависимости от концентрации CaCl₂: 1 — 30 мМ, 2 — 40 мМ, 3 — 50 мМ, К — клетки в 10 мМ трис-НС1; по горизонтали — время выдерживания клеток в растворе CaCl₂ при 4 °С, сут

связи этих параметров с конечным выходом трансформантов (рис. 1 и 2). Как можно видеть на рис. 1 *a*, динамика падения выживаемости клеток практически одинакова для концентраций CaCl₂ от 30 до 50 мМ, тогда как выход трансформантов существенно выше при концентрации 50 мМ по сравнению с концентрацией 40 мМ и особенно 30 мМ (рис. 1, *б*). На рис. 2 выход трансформантов изучен на фоне выживаемости клеток и доли суперскрученной ДНК для концентраций от 0 до 50 мМ CaCl₂. Можно видеть, что выживаемость клеточной популяции после резкого падения до 37 % на 10 мМ CaCl₂ стабилизируется и от 20 до 50 мМ держится в пределах 56–69 %. Доля

суперскрученной ДНК находится практически в одних и тех же пределах, незначительно снижаясь на концентрациях 40–50 мМ. Следует отметить, что отличия выживаемости клеток на концентрациях от 20 до 50 мМ CaCl₂ так же, как и отличия в доле суперскрученной ДНК на всех концентрациях CaCl₂, имеют недостоверный характер. Как и на рис. 1, наибольший выход трансформантов соответствует концентрации 50 мМ, а самый низкий — 30 мМ CaCl₂; при концентрациях 10 и 20 мМ трансформация полностью отсутствует. Эти данные свидетельствуют о том, что в присутствии одного CaCl₂ такие параметры, как выживаемость клеток и суперскрученность ДНК, не зависят, а количество трансформантов зависит от концентрации CaCl₂.

Поскольку в наших опытах оптимальной концентрацией Ca²⁺ оказалась 50 мМ, именно эта концентрация была выбрана нами как контроль для всех остальных экспериментов, направленных на моделирование таких условий, при которых можно было бы отследить связь между выживаемостью CaCl₂-обработанных клеток, конформацией трансформирующей ДНК и конечным выходом трансформантов. Такие данные могли бы облегчить понимание эффекта дополнительных ингредиентов, в том числе растительных экстрактов, введенных в стандартную трансформационную смесь, что необходимо при использовании системы трансформации для изучения механизмов взаимодействия с бактериями широкого круга веществ как природного, так и искусственного происхождения.

С этой целью мы использовали известный факт повышения эффективности трансформации при введении солей RbCl и BaCl₂ в стандартный CaCl₂-трансформационный буфер. Причина этого явления остается неизученной, несмотря на достаточно широкое его использование в молекулярной биологии и геномной инженерии. В настоящей работе нам удалось, манипулируя различными комбинациями солей, найти экспериментальный подход, в определенной степени позволяющий дифференцировать уровень, на котором происходят колебания как выживаемости клеток, так и эффективности трансформации, для чего выход трансформантов сравнивали с выжи-

ваемостью CaCl_2 -обработанных клеток и содержанием суперскрученной формы в препарате трансформирующей плазмидной ДНК. В качестве контроля использовали тот же препарат ДНК в 10 мМ трис-буфере, содержание суперскрученной формы в котором условно принимали за 100 %. Контролем эффективности трансформации и выживаемости компетентных клеток, которые также принимали за 100 %, служили конечный выход трансформантов и выживаемость клеток при использовании 50 мМ кальциевого буфера.

Согласно данным, представленным на рис. 3, присутствие RbCl в трансформационном буфере повышает содержание суперскрученной формы ДНК до 163 %, выживаемость компетентных клеток — до 326 %, а выход трансформантов — до 1918 %. В то же время выход трансформантов в присутствии одного лишь RbCl составлял 0 % при повышении содержания суперскрученной формы ДНК до 168 % и выживаемости клеток до 394 %, т.е. катионы Rb^+ повышают эффективность трансформации только в присутствии ионов Ca^{2+} , но сами по себе участия в формировании компетентности клеток не принимают. В присутствии одного BaCl_2 -буфера выход трансформантов понижался до 77 %, а выживаемость клеточной популяции до 55 % при повышении содержания суперскрученной формы до 154 %. При сочетании ионов Ba^{2+} с ионами Ca^{2+} эти же параметры составляют: 148 % (выживаемость), 131 % (доля суперскрученной формы) для сочетания Ca^{2+} 40 мМ + Ba^{2+} 10 мМ; 122 % (выживаемость), 156 % (доля суперскрученной формы ДНК) для сочетания Ca^{2+} 10 мМ + Ba^{2+} 40 мМ.

Совокупность полученных данных дает основание предполагать, что в присутствии солей Rb^+ и Ba^+ происходит повышение выхода трансформантов, которое обусловлено повышением общей жизнеспособности клеток, обеспечивающей таким образом формирование более значительного клеточного пула. В опытах с Ba^{2+} ситуация представляется более сложной, поскольку в этом случае наблюдается явная синергидность взаимодействия ионов Ca^{2+} и Ba^{2+} , объединение которых в трансформационном буфере приводит к повышению как выживаемости обработанных клеток, так и общего выхода трансформантов. При этом

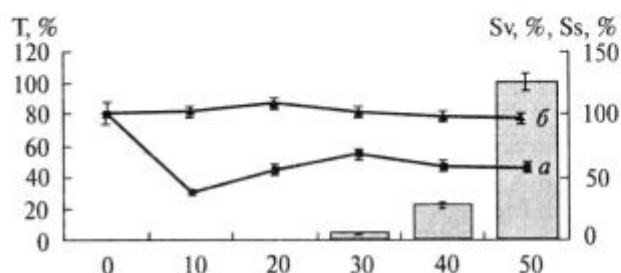


Рис. 2. Выход трансформантов, выживаемость клеток и доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК в зависимости от концентрации CaCl_2 (по горизонтали — мМ) (клетки выдерживали 20 ч при 4 °С): столбики — выход трансформантов (проц. от числа трансформантов в 50 мМ CaCl_2 -буфере — Т %); а — выживаемость клеток (проц. от числа выживших в 10 мМ трис- HCl буфере клеток — Sv, %); б — доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК (проц. от содержания суперскрученной формы в 10 мМ трис- HCl буфере — Ss, %)

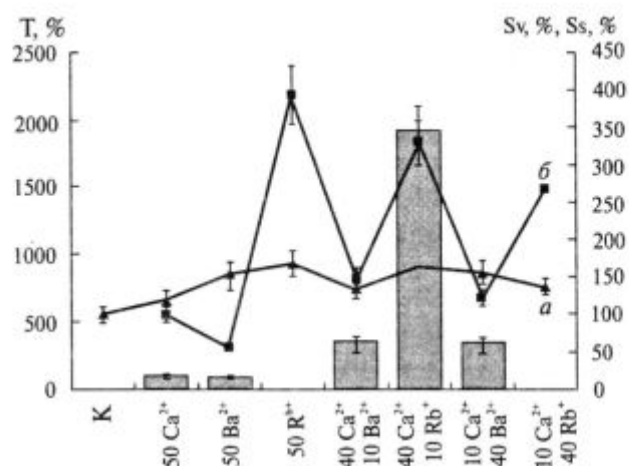


Рис. 3. Выход трансформантов, выживаемость клеток и доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК в зависимости от состава и концентрации (в мМ) использованных солевых буферов (клетки выдерживали 20 ч при 4 °С): столбики — выход трансформантов (проц. от числа трансформантов в 50 мМ CaCl_2 -буфере — Т, %); а — выживаемость клеток (проц. от числа выживших в 50 мМ CaCl_2 -буфере — Sv, %); б — доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК (проц. от содержания суперскрученной формы в 10 мМ трис- HCl буфере — Ss, %)

разное количественное сочетание используемых солей (40 мМ Ca^{2+} + 10 мМ Ba^{2+} или 10 мМ Ca^{2+} + 40 мМ Ba^{2+}) не имеет значения, поскольку обеспечивает практически одинаковый результат как в отношении выживаемости кле-

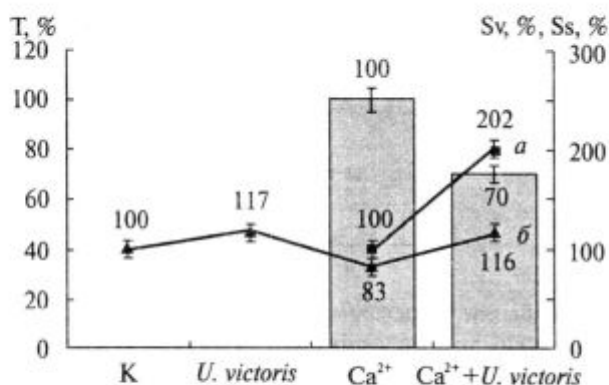


Рис. 4. Выход трансформантов, выживаемость клеток и доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК в зависимости от присутствия экстракта *U. victoris*: столбики — выход трансформантов (проц. от числа трансформантов в 50 мМ CaCl₂-буфере — T, %); *a* — выживаемость клеток (проц. от числа выживших в 50 мМ CaCl₂-буфере — Sv, %); *б* — доля суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК (проц. от К — содержания суперскрученной формы в 10 мМ трис-НСl буфере — Ss, %)

ток, так и в отношении выхода трансформантов. Каким бы ни был механизм действия ионов Rb⁺, Ca²⁺ и Ba²⁺, создается впечатление, что во всех этих случаях именно повышение общей выживаемости клеток обуславливает повышение уровня трансформации. Менее логичным было бы представить противоположную зависимость — повышение уровня выживаемости, т.е. жизнеспособности клеток, как следствие повышения уровня трансформации, обусловленной, как известно, определенными дефектами и проницаемостью клеточной оболочки.

Определенный вклад в повышение выхода трансформантов в присутствии солей Ba²⁺ и Rb⁺ вносит, очевидно, и наблюдающаяся в этом случае тенденция к повышению доли суперскрученной формы в плазмидной ДНК (рис. 3). Если за 100 % принять содержание суперскрученной ДНК в трис-буфере, то можно видеть, что наиболее слабому выходу трансформантов (Ca²⁺) соответствует слабое повышение доли суперскрученной формы, а наиболее высокому выходу трансформантов соответствует наиболее высокий уровень суперскрученности плазмидной ДНК (Ca²⁺ 40 мМ + Rb⁺ 10 мМ). Однако в отличие от выживаемости повышение доли суперскрученной формы ДНК в при-

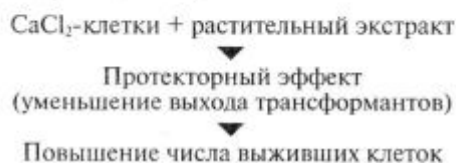
сутствии ионов Ba²⁺ и Rb⁺ не может рассматриваться как фактор, определяющий общее повышение эффективности трансформации. Об этом свидетельствует тот факт, что снижение уровня выхода трансформантов в варианте Ba²⁺ до 77 % по сравнению с вариантом Ca²⁺ (100 % выхода трансформантов) происходит на фоне повышения доли суперскрученной ДНК до 154 % по сравнению со 118 %, показанными для варианта Ca²⁺.

В общем события, происходящие в результате введения в среду для CaCl₂-обработанных клеток ионов Rb⁺ и Ba²⁺, можно представить в виде следующей цепочки событий:



Иная картина наблюдается в случае введения в трансформационную смесь растительного экстракта. Как можно видеть из данных, представленных на рис. 4, присутствие экстракта *U. victoris* снижает эффективность трансформации (70 % от контроля) на фоне повышения выживаемости обработанных клеток до 202 % и повышения содержания суперскрученной формы ДНК до 116 %. В отличие от вариантов с солями Rb⁺ и Ba²⁺ этот подъем не сказывается на конечном выходе трансформантов, поскольку повышение содержания суперскрученной формы ДНК в присутствии экстракта *U. victoris* не приводит к повышению выхода трансформантов по сравнению с контрольным Ca²⁺-вариантом. Кроме того, в отличие от опытов с добавлением ионов Rb⁺ и Ba²⁺ в опытах с экстрактом *U. victoris* не прослеживается также зависимость эффективности трансформации от повышения уровня выживаемости компетентных клеток. В этом случае повышение уровня выживаемости CaCl₂-обработанных клеток происходит, видимо, в результате защиты клеточной поверхности от образования клеточных пор в присутствии растительного экстракта и по отношению к процессу трансформации как таковому имеет вторичный характер, играя роль не причины, а следствия. Поэтому в данной экспериментальной системе в отличие от варианта с ионами

Rb⁺ и Ba²⁺ цепочку событий можно представить следующим образом:



Таким образом, в системе трансформации CaCl₂-обработанных клеток *E. coli* плазмидной ДНК четко прослеживаются два возможных пути повышения выживаемости. Первый из них наблюдается при введении в систему солей Rb⁺ и Ba²⁺ и может расцениваться как средство повышения уровня выхода трансформантов. Особенно четким этот эффект выглядит в варианте с Rb⁺, повышающим выживаемость клеток как в присутствии Ca²⁺, так и без него, из чего следует, что влияние Rb⁺ на выживаемость имеет совершенно самостоятельный характер. Соли Ba²⁺ в отличие от Rb⁺ повышают выживаемость только CaCl₂-обработанной бактериальной культуры. Это позволяет предположить наличие некоторого антагонизма в проявлениях биологической активности солей Ba²⁺ и Ca²⁺ в случае их совместного использования. Второй путь повышения числа выживших клеток может объясняться восстановлением нормального состояния поврежденной CaCl₂ клеточной стенки и носит характер вторичного события, сопровождающего понижение уровня эффективности трансформации. Что касается наблюдаемых нами колебаний содержания доли суперскрученной формы в препарате трансформирующей плазмидной ДНК, то они имеют, очевидно, гораздо менее важное значение для процесса трансформации по сравнению с состоянием оболочки компетентной клетки и общей жизнеспособностью клеточной популяции.

Выводы. Система трансформации CaCl₂-обработанных клеток *E. coli* плазмидной ДНК позволяет дифференцировать различные механизмы колебаний выхода трансформантов и жизнеспособности клеток в присутствии различных веществ. В рамках использованной экспериментальной системы можно определить процессы, осуществляющиеся как на уровне общей жизнеспособности клеток (повышение выживаемости), так и на уровне кле-

точной оболочки (защита целостности поверхностных структур клетки экстрактом *U. victoris*).

SUMMARY. In the system of cation-induced *E. coli* transformation by the plasmid pBR322 the effects of the extract derived from the biomass of cultured cells of *U. victoris* on the correlation between yield of transformants, viability of CaCl₂ — treated cells and plasmid DNA conformation alterations has been investigated. The data obtained have been compared with effects of some salts of one- and divalent metals on the same parameters. The presence of different mechanisms of the variations of cell population viability and yield of transformants depending on utilization of salts or plant extracts has been shown.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mandel M., Higa A. Calcium-dependent bacteriophage Dna infection // *J. Mol. Biol.* — 1970. — 53. — P. 159.
2. Van Die I.M., Van Osterhout A., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M. The influence of phase transition of membrane lipids on uptake of plasmid DNA in *Escherichia coli* transformation // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1983. — 18, № 1/2. — P. 127—130.
3. Van Die I.M., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M. Studies on the role of the heat shock in induction of competence // *J. Gen. Microbiol.* — 1983. — 129, № 3. — P. 663—670.
4. Verkleij A.J., de Kruijff B., Ververgaert P.H.J.Th., Tocanne J.I., van Deenen J.L.M. The influence of pH, Ca²⁺ and protein on the thermotropic behavior of the negatively charged phospholipid, phosphatidylglycerol // *Biochim. et biophys. acta.* — 1974. — 339. — P. 432—437.
5. Reasch R.N., Hiske T.W., Sadoff H.L. Poly-β-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* — 1986. — 168. — P. 553—562.
6. Reasch R.N., Sadoff H.L. Putative structure and function of a poly-β-hydroxybutyrate / calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1988. — 85. — P. 4176—4180.
7. Huang R., Rousch R. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly-β-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations // *J. Bacteriol.* — 1995. — 177, № 2. — P. 486—490.
8. Мирота Г.Ю., Дворник А.С., Можилевська Л.П., Перерва Т.П. Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК // *Біополімери і клітина.* — 2003. — 19, № 6. — С. 525—529.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 469 с.
10. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.

Поступила 16.05.05