

Изучение влияния экстракта *Ungernia victoris* на эффективность трансформации клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК

А.Ю. Мирюта, Л.П. Можилевская, Т.П. Перерва

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

Как известно, в основе механизма трансформации *E.coli* плазмидной ДНК лежит переход бактериальной клетки в так называемое состояние компетентности, обеспечивающее поглощение ДНК, то есть проникновение ее через клеточную стенку внутрь бактерии. Методика получения компетентных клеток и последующей их трансформации плазмидой включает в себя использование ионов Ca^{2+} и теплового шока при 42°C [1]. В результате такой обработки фосфолипидный слой оболочки бактерии претерпевает изменения, именуемые фазовым переходом, за счет чего и достигается временная проницаемость клеточной стенки [2]. Считается, что во время фазового перехода образуются разрывы в упаковке липидов на границах гель- и жидкокристаллических доменов мембраны и, возможно, на границах липидов и агрегированных мембранных белков. 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 [3]. Предполагается, что эти комплексы образуют каналы или дефекты в двойном липидном слое и тем самым способствуют переносу НК [4].

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 культивированных *in vitro* клеток лекарственных растений).

В настоящей работе изучали влияние экстракта из биомассы культивированных *in vitro* клеток *Ungernia 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.

Совокупность полученных данных дает основание предполагать, что в присутствии как Rb^+ , так и Ba^+ повышение выхода трансформантов обусловлено повышением общей жизнеспособности клеток, обеспечивающей таким образом формирование более значительного клеточного пула.

Определенный вклад в повышение выхода трансформантов в присутствии солей Ba^{2+} и Rb^+ вносит, очевидно, и наблюдающаяся в этом случае тенденция к повышению доли суперскрученной формы в препарате плазмидной ДНК, определяемая с использованием программы «Scion Image».

В общем, события, происходящие в результате введения в популяцию CaCl_2 – обработанных клеток ионов Rb^+ и Ba^{2+} можно представить в виде следующей цепочки событий:

CaCl_2 - клетки + Ba^{2+} (Rb^+)



повышение числа выживших клеток



повышение уровня выхода трансформантов.

В то же время присутствие экстракта *U.victoris* снижает эффективность трансформации на фоне повышения выживаемости обработанных клеток до 202% и повышения содержания суперскрученной формы ДНК до 116%. В отличие от вариантов с солями Rb^+ и Ba^{2+} 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 Ca^{2+} - вариантом. Кроме того, в отличие от опытов с добавлением ионов Rb^+ и Ba^{2+} в опытах с экстрактом *U.victoris* не прослеживается также зависимость эффективности трансформации от повышения уровня выживаемости компетентных клеток. Скорее всего, в этом случае повышение уровня выживаемости $CaCl_2$ - обработанных клеток происходит 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 Ba^{2+} , цепочку событий можно представить следующим образом:

$CaCl_2$ - клетки + растительный экстракт



протекторный эффект

(уменьшение выхода трансформантов)



повышение числа выживших клеток.

Таким образом, в системе трансформации $CaCl_2$ -клеток *E.coli* плазмидной ДНК четко прослеживаются два возможных механизма повышения выживаемости $CaCl_2$ -обработанных клеток. Первый из них обусловлен, очевидно, повышением общего уровня метаболизма клетки за счет введения в нее некоторых солей (Rb^+ , Ba^{2+}) и может расцениваться как

причина повышения уровня выхода трансформантов. Второй механизм повышения числа выживших клеток может объясняться восстановлением нормального состояния поврежденной CaCl_2 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 с общей жизнеспособностью клеточной популяции.

Литература

1. *Mandel M., Higa A.* Calcium-dependent bacteriophage Dna infection // *J. Mol. Biol.* - 1970 - 53.- P. 159-162.
2. *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.
3. *Reasch R.N., Sadoff H.L.* Putative structure and function of a poly- β -hydroxybutyrate / calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988.- 85. - P. 4176-4180.
4. *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.