

М. Ф. Алексєєв, Н. В. Гуньковська

МЕТОД ШВИДКОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ЕНТЕРОБАКТЕРІЙ ТА ДЕЯКІ ФАКТОРИ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ЙОГО ЕФЕКТИВНІСТЬ

Описано дві модифікації методу заморожування — відтавання для трансформації ентеробактерій: стандартна та спрощена. Перша дозволяє на протязі години трансформувати *Escherichia coli* JM109 і *Klebsiella oxytoca* VN13 з ефективністю до $2,5 \cdot 10^5$ трансформантів на 1 мкг ДНК. Друга дає можливість за 5 хв трансформувати ці штами з ефективністю $1 \cdot 10^4$ трансформантів на 1 мкг ДНК. Модифікації були успішно використані для трансформації *Enterobacter cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531 і *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* IMB 8351.

Вступ. Трансформація ентеробактерій плазмідною ДНК є звичайною процедурою у молекулярному клонуванні. Проте відносно низька трансформованість природних штамів *Klebsiella* [1, 2] та інших ентеробактерій є причиною того, що у ці організми, як правило, вводять готові генноінженерні конструкції. За такої організації експериментів фактор часу відіграє велику роль і, як наслідок, проблема розробки швидких, але достатньо ефективних методів введення плазмідної ДНК у ентеробактерії є актуальною. Стандартні процедури, які використовують для виготовлення компетентних клітин *Klebsiella* та інших ентеробактерій (звичайно для цієї мети користуються методом, розробленим Cohen [3], та його модифікаціями), займають багато часу. При цьому засоби тривалого збереження компетентних клітин бактерій, відмінних від *Escherichia coli*, розроблені погано. Більш того, звичайно нема необхідності (або можливості) зберігати препарати компетентних клітин усіх штамів, з якими працюють у лабораторії. Нещодавно Merrick et al. [4] опублікували модифікований метод заморожування — відтавання для трансформації *E. coli* і *Klebsiella*. Незважаючи на досить високу ефективність цього метода (до $7 \cdot 10^4$ трансформантів на 1 мкг ДНК для *K. aerogenes*), він обіймає досить тривалі етапи «розгонки» нічної культури (2 год) та інкубації клітин після відтавання (2—4 год.). Ми пропонуємо дві модифікації цього методу: стандартну та спрощену. Остання виключає використання обох цих стадій і дозволяє на протязі 5 хв зробити трансформацію *E. coli* та *K. oxytoca* з ефективністю біля $1 \cdot 10^4$ трансформантів на 1 мкг ДНК.

Матеріали і методи У роботі використовували штами *E. coli* JM109 (rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, sup E44, rel A1, λ —, Δ (lac-pro A, B), F', tra D36, lac IqZ Δ -M15) [5]; *K. oxytoca* VN13 — дикий тип, ізольована з ґрунту рисових ланів північного В'єтнаму [6]. Штами *Enterobacter cloacae* CCM1902 (CCM — Чесько-Словацька колекція мікроорганізмів), *E. aerogenes* CCM2531, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* IMB8351 (IMB — колекція мікроорганізмів Ін-ту мікробіології і вірусології АН України) отримано від О. Є. Жеребило (IMB АН України). Плазмиду *pUC4k* [7] (люб'язно надана С. Ю. Єрмаковою, МДУ ім. Ломоносова) було очищено рівноважним центрифугуванням у градієнті щільності CsCl, як описано у [8].

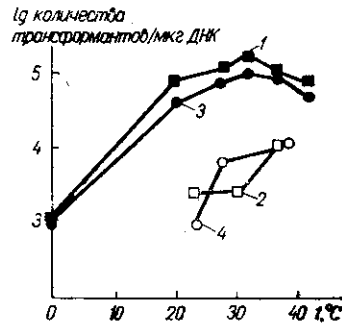
Нижче наведено протоколи стандартної та спрощеної модифікацій методу Merrick et al. [4].

З чашки із свіжими (6—24 год) колоніями зішкребіть 1—2 колонії розміром 2—3 мм або еквівалентну кількість матеріалу (намагайтеся не захопити агару). Клітини суспендуйте у 100 мкл попередньо охолодженого до 0 °С 0,1 М CaCl₂ у пластиковій центрифужній пробірці (1,5 мл). До суспензії додайте ДНК у об'ємі не більш 10 мкл. Після цього заморозьте клітини у рідкому азоті (30—60 с) та влаштуйте на водяну баню (32 °С) на 2 хв для відтавання. Далі: (стандартно)

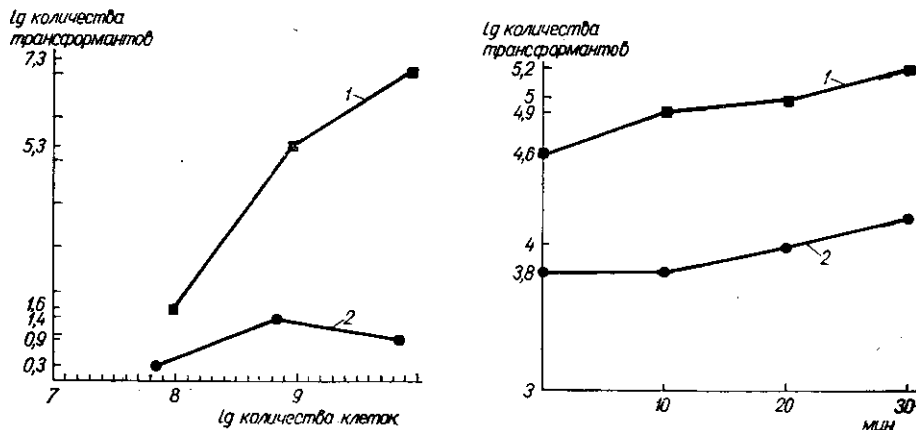
дартна модифікація) клітини розведіть 900 мкл LB, інкубуйте 1 год при 37 °С та висійте відповідні розведення на селективну чашку (при необхідності можна сконцентрувати клітини центрифугуванням); (спрощена модифікація) висійте усі клітини або частину на селективну чашку.

Результати і обговорення. Вплив короткочасного заморожування на життєздатність клітин. Визначення кількості життєздатних клітин *E. coli* і *K. oxytoca* у суспензії до та після заморожування при -196 °С виявило, що титр клітин *E. coli* JM109 і *K. oxytoca* VN13 знижується відповідно на 13 і 50 %, тобто в меншому ступені, ніж у роботі Merrick et al. [4]. Певно, це пояснюється генетичними властивостями штамів.

Мал. 1. Вплив температури і швидкості відтавання на ефективність трансформації: 1 — *K. oxytoca* VN13, відтавання у водяній бані; 2 — *K. oxytoca* VN13, відтавання у повітряному термостаті; 3 — *E. coli* JM109, відтавання у водяній бані; 4 — *E. coli* JM109, відтавання у повітряному термостаті



Вплив температури і швидкості відтавання на ефективність трансформації. Для визначення впливу температури та швидкості відтавання на ефективність трансформації клі-



Мал. 2. Вплив концентрації клітин на ефективність трансформації: 1 — *K. oxytoca* VN13; 2 — *E. coli* JM109

Мал. 3. Вплив інкубації у CaCl₂ до заморожування на ефективність трансформації: 1 — *K. oxytoca* VN13; 2 — *E. coli* JM109

тини суспендували у CaCl₂, змішували з ДНК і заморожували у рідкому азоті. Відтавання провадили у водяній бані (при 0 °С — 30 хв, при інших *t* — 2 хв) або повітряному термостаті (при 23 °С — 10 хв; 30; 37 °С — 8 хв). Результати наведено на мал. 1. Як видно, відтавання клітин у повітряному термостаті не настільки ефективне, як аналогічний процес у водяній бані (певно, внаслідок більш низької швидкості відтавання). Оптимальною температурою відтавання обох штамів є 32 °С.

Вплив концентрації клітин. Дані, які ілюструють вплив концентрації клітин на ефективність трансформації, наведено на мал. 2. З них випливає, що ефективність трансформації дещо спадає при зниженні концентрації клітин у суспензії для *K. oxytoca* VN13. Штам *E. coli* JM109 має оптимум концентрації клітин біля 1 · 10⁹.

Вплив концентрації CaCl_2 . Оптимальну концентрацію CaCl_2 визначали наступним чином: клітини *E. coli JM109* і *K. oxytoca VN13* суспендували при 0°C у стерильній деіонізованій воді до концентрації $1,8 \cdot 10^9$ і $1,1 \cdot 10^{10}$ кл/мл відповідно, змішували з ДНК та фасували по 90 мкл у попередньо охолоджені пластикові центрифужні пробірки (1,5 мл). До кожної пробірки додавали по 10 мкл стокових 10-разових розчинів CaCl_2 до концентрації 12,5; 25; 50; 75; 100 і 200 мМ. Ефективність трансформації встановлювали після циклу заморожування — відтавання та 1 год. інкубації у середовищі LB для експресії селективного маркера. Оптимальною для *E. coli JM109* та *K. oxytoca VN 13* є концентрація CaCl_2 75 мМ.

Вплив додаткової інкубації у середовищі LB. Для його визначення провадили висіви з однієї пробірки до і після інкубації у LB на протязі 1 год. при 37°C . За нашими даними, така інкубація збільшує кількість трансформантів у 3—8,7 та 2,5—10 разів відповідно для *K. oxytoca VN13* і *E. coli JM109*. Це збільшення, певно, є наслідком адаптації бактеріальних клітин після стресового впливу, яким є цикл заморожування — відтавання, а також того, що за цей період відбувається експресія селективного маркера.

Вплив концентрації клітин при додатковій інкубації. Для визначення впливу концентрації клітин при додатковій інкубації після відтавання суспензії її розводили у 10 і 100 разів у середовищі LB та фізіологічному розчині, інкубували розведення 1 год при 37°C і висівали на селективні чашки. Як при інкубації у LB, так і при інкубації у фізіологічному розчині ефективність трансформації збільшувалася у 1,6 і 1,8 разів відповідно для *K. oxytoca VN13* і *E. coli JM109* при розведенні у 100 разів порівняно з розведенням у 10 разів.

Вплив інкубації у CaCl_2 до заморожування. Результати, що ілюструють вплив інкубації у CaCl_2 до заморожування на ефективність трансформації, наведено на мал. 3. Як можна побачить з цього малюнка, введення у стандартний протокол 30-хвилинного періода інкубації у CaCl_2 до заморожування збільшує ефективність трансформації *K. oxytoca VN13* і *E. coli JM109* відповідно у 4 і 3 рази.

Вплив маркера, яким користуються для селекції. *E. coli JM109* трансформується плазмідною *pUC4k* за маркером Amp^r із частотою, удвічі більшою, ніж за маркером Km^r . Ми не маємо аналогічних даних для штаму *K. oxytoca VN13* внаслідок його природної стійкості до ампіциліну у концентрації понад 200 мкг/мл.

Вплив температури заморожування визначали наступним чином: клітини суспендували у CaCl_2 при 0°C , змішували з ДНК, фасували у попередньо охолоджені до 0°C стерильні центрифужні пробірки (1,5 мл) та заморожували при відповідній температурі. Після заморожування клітини висівали на селективні чашки.

Вплив температури заморожування на ефективність трансформації

Режим заморожування	Ефективність трансформації (кількість трансформантів на 1 мкг ДНК)	
	<i>E. coli JM109</i>	<i>K. oxytoca VN13</i>
-20°C		
стандартна модифікація;		
стандартна модифікація+30 хв інкубації у CaCl_2 до	$3,1 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^4$
заморожування;		
спрощена модифікація	$2,2 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$
	25	$4,3 \cdot 10^3$
-70°C		
стандартна модифікація;		
стандартна модифікація+30 хв інкубації у CaCl_2 до	75	$3,6 \cdot 10^3$
заморожування;		
спрощена модифікація	$1,5 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^3$
	25	$4,8 \cdot 10^2$

Merrick et al. встановили, що температура заморожування практично не впливає на ефективність трансформації [4]. За нашими даними, глибоке заморожування при -20 і -70 °C у морозильній камері є набагато менш ефективним, ніж заморожування у рідкому азоті (таблиця).

Процедура заморожування — відтавання, вперше використана авторами [9] для індукції поглинання фагової ДНК клітинами *E. coli* та *Proteus vulgaris*, є складовою частиною багатьох високоефективних методик трансформації *E. coli* [10, 11]. Показано, що ця процедура може бути використана для трансформації різних видів *Klebsiella* [4, 12], *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* LR 5000 [4] і *Agrobacterium tumefaciens* [13]. Ми успішно використали наведені нами модифікації методу [4] для трансформації *E. coli* JM109, *K. oxytoca* VN13, *E. cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531 і *E. carotovora* subsp. *carotovora* IMB8351. При цьому стандартна модифікація, що практично дорівнює за ефективністю методу Merrick et al. [4], дозволяє скоротити час, який витрачають на трансформацію, з 4—6 до 1 год. Спрощена модифікація дозволяє ще більш скоротити час (до 5 хв). При цьому ефективність трансформації дещо знижується. Наведені модифікації виключно вигідні для введення готових генноінженерних конструкцій до клітин різних ентеробактерій і, певно, тих штамів *Pseudomonas* і *Agrobacterium*, які можуть бути трансформовані за допомогою метода заморожування—відтавання.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Matsumoto H., Tasaki T. Genetic recombination in *Klebsiella pneumoniae* // Jap. J. Microbiol.—1970.—14, N 2.—P. 129—141.
2. Montgomerie J. Z. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections // Rev. Infect. Diseases.—1979.—1, N 5.—P. 736—753.
3. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1972.—69, N 8.—P. 2110—2114.
4. Merrick M., Gibbins J., Postgate J. A rapid and efficient method for plasmid transformation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* // J. Gen. Microbiol.—1987.—133, N 8.—P. 2053—2057.
5. Клонирование ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера.—М.: Мир, 1988.—538 с.
6. Азотфиксирующие бактерии клонируют ксилему корня риса / Т. Н. Х. Нгуен, Т. Н. Б. Тон, В. А. Тарасенко и др. // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 97—99.
7. Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene.—1982.—19, N 3.—P. 252—268.
8. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
9. Frozen-thawed bacteria as recipients of isolated coliphage DNA / S. Y. Dityatkin, K. V. Lisovskaya, N. N. Pfnzhava, B. N. Iliashenco // Biochim. et biophys. acta.—1972.—281, N 2.—P. 319—323.
10. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // J. Mol. Biol.—1983.—166, N 4, 5.—P. 557—580.
11. Inoue H., Nojima H., Okayama H., High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene.—1990.—93, N 1.—P. 23.
12. Camprubi S., Regue M., Tomas J. The influence of lipopolysaccharide on the transformation efficiency of *Klebsiella pneumoniae* // Can. J. Microbiol.—1989.—35, N 7.—P. 735—737.
13. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* / M. Holsters, D. de Waele, A. Depicker et al. // Mol. and Gen. Genet.—1978.—163, N 2.—P. 181—187.

Лн-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ

Одержано 17.09.91