

11. White P. J., Kelly B. Diaminopimelate decarboxylase (*E. coli*) // *Ibid.*—1971.—17, N 1.—P. 140—145.
12. Work E. Diaminopimelic acid // *Ibid.*—1963.—6, N 3.—P. 624—634.
13. Баздырева М. Н., Куцева Л. С. Спектрофотометрический метод определения лизина в культуральной жидкости *Brevibacterium 22* // Прикл. биохимия и микробиология.—1974.—10, № 5.—С. 756—760.
14. Kalcheva E. O., Faiziev M. M., Maluta S. S. The isolation and comparative analysis of diaminopimelate decarboxylases from *Streptococcus bovis* and *Bacillus subtilis* // *Biochem. and Biotechnol. Electronic Express.*—1991.—1, N 4.—P. 7—14.
15. Použitie kolonizačného preparátu Amylastim v stimulácii bachorového typu trávenia mládat prezúvavcov / V. Kmet, G. I. Kalachnyuk, S. Konik et al. // *Veter. Med.*—1987.—32, N 5.—P. 705—709.
16. DAP-decarboxylase activity and lysine production by rumen bacteria / I. Styriak, E. O. Kalcheva, V. Kmet, S. S. Maljuta // *Arch. Anim. Nutr.*—1991.—38.—P. 317—323.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев
Ин-т микробиологии АН УзССР, Ташкент
Ин-т физиологии животных САН, Кошице, ЧСАР

Получено 03.07.91

УДК 577.2.08+579.254.2

М. Ф. Алексеев, Н. В. Гуньковская

МЕТОД БЫСТРОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Описаны две модификации метода замораживания-оттаивания для трансформации энтеробактерий: стандартная и упрощенная. Первая позволяет в течение 1 ч трансформировать *Escherichia coli* IM109 и *Klebsiella oxytoca* VN13 с эффективностью до $2,5 \cdot 10^6$ трансформантов на 1 мкг ДНК. Вторая дает возможность за 5 мин трансформировать эти штаммы с эффективностью $1 \cdot 10^4$ трансформантов на 1 мкг ДНК. Модификации были успешно использованы для трансформации *Enterobacter cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531 и *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ИМВ8351.

Введение. Трансформация энтеробактерий плазмидной ДНК является обычной процедурой в молекулярном клонировании. Однако относительно низкая трансформируемость природных штаммов *Klebsiella* [1, 2] и других энтеробактерий является причиной того, что в эти организмы, как правило, вводятся готовые генноинженерные конструкции. При такой организации экспериментов фактор времени играет большую роль и, следовательно, проблема разработки быстрых, но достаточно эффективных методов введения плазмидной ДНК в энтеробактерии является актуальной. Стандартные процедуры, используемые для приготовления компетентных клеток *Klebsiella* и других энтеробактерий (обычно для этих целей используется метод, разработанный Cohen [3], и его модификации), занимают много времени. При этом способы длительного хранения компетентных клеток бактерий, отличных от *Escherichia coli*, разработаны слабо. Более того, обычно нет необходимости (или возможности) хранить препараты компетентных клеток всех штаммов, с которыми работают в лаборатории. Недавно Merrick et al. [4] опубликовали модифицированный метод замораживания — оттаивания для трансформации *E. coli* и *Klebsiella*. Несмотря на довольно высокую эффективность этого метода (до $7 \cdot 10^4$ трансформантов на 1 мкг ДНК для *K. aerogenes*), он включает в себя довольно длительные этапы «разгонки» ночной культуры (2 ч) и инкубации клеток после оттаивания (2—4 ч). Мы предлагаем две модификации этого метода: стандартную и упрощенную. Последняя исключает использование обеих этих стадий и позволяет в течение 5 мин произвести трансформацию

© М. Ф. АЛЕКСЕЕВ, Н. В. ГУНЬКОВСКАЯ, 1992

E. coli и *K. oxytoca* с эффективностью около $1 \cdot 10^4$ трансформантов на 1 мкг ДНК.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *E. coli* JM109 (rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, sup E44, rel A1, λ —, Δ (lac-proA, B), F', tra D36, lac IqZ Δ -M15) [5]; *K. oxytoca* VN13 — дикий тип, изолирована из почвы рисовых полей северного Вьетнама [6]. Штаммы *Enterobacter cloacae* CCM1902 (ССМ — Чехо-Словацкая коллек-

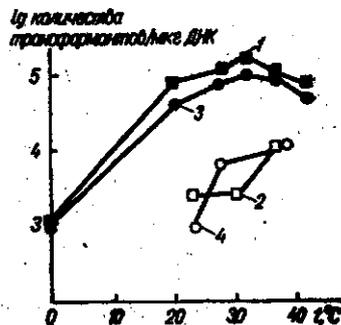


Рис. 1. Влияние температуры и скорости оттаивания на эффективность трансформации: 1 — *K. oxytoca* VN13, оттаивание в водяной бане; 2 — то же в воздушном термостате; 3 — *E. coli* JM109, оттаивание в водяной бане; 4 — то же в воздушном термостате

ция микроорганизмов), *E. aerogenes* CCM2531, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ИМВ8351 (ИМВ — коллекция микроорганизмов Ин-та микробиологии и вирусологии АН Украины) получены от О. Е. Жеребило. Плазмида *pUC4k* [7] (любезно предоставлена С. Ю. Ермаковой, МГУ им. Ломоносова) была очищена равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl, как описано в [8].

Ниже приводятся протоколы стандартной и упрощенной модификаций метода Merrick et al [4].

С чашки со свежими (6—24 ч) колониями соскребите 1—2 колонии размером 2—3 мм или эквивалентное количество материала (старайтесь не захватить агар). Клетки суспендируйте в 100 мкл предварительно охлажденного до 0 °С 0,1 М CaCl₂ в пластиковой центрифужной пробирке (1,5 мл). В суспензию добавьте ДНК в объеме не более 10 мкл. После этого заморозьте клетки в жидком азоте (30—60 с) и поместите на водяную баню (32 °С) на 2 мин для оттаивания. Далее (стандартная модификация) клетки разведите 900 мкл LB, инкубируйте 1 ч при 37 °С и высейте соответствующие разведения на селективную чашку (при необходимости можно сконцентрировать клетки центрифугированием); (упрощенная модификация) сразу высейте все клетки или часть на селективную чашку.

Результаты и обсуждение. Влияние кратковременного замораживания на жизнеспособность клеток. Определение числа жизнеспособных клеток *E. coli* и *K. oxytoca* в суспензии до и после замораживания при —196 °С показало, что титр клеток *E. coli* JM109 и *K. oxytoca* VN13 снижается соответственно на 13 и 50 %, т. е. в меньшей степени, чем в работе Merrick et al. [4]. По-видимому, это объясняется генетическими свойствами штаммов.

Влияние температуры и скорости оттаивания на эффективность трансформации. Для определения влияния температуры и скорости оттаивания на эффективность трансформации клетки суспендировали в CaCl₂, смешивали с ДНК и замораживали в жидком азоте. Оттаивание производили в водяной бане (при 0 °С — 30 мин, при других *t* — 2 мин) или в воздушном термостате (при 23 °С — 10 мин; 30; 37 °С — 8 мин). Результаты представлены на рис. 1. Как видно, размораживание клеток в воздушном термостате не столь эффективно, как аналогичный процесс в водяной бане (по-видимому, вследствие более низкой скорости оттаивания). Оптимальная температура оттаивания для обоих штаммов 32 °С.

Влияние концентрации клеток. Данные, иллюстрирующие влияние концентрации клеток на эффективность трансформации, представлены на рис. 2. Из них следует, что эффективность трансформации несколько падает при снижении концентрации клеток в суспен-

зии для *K. oxytoca* VN13. Штамм *E. coli* JM109 имеет оптимум концентрации клеток около $1 \cdot 10^9$.

Влияние концентрации CaCl_2 . Оптимальную концентрацию CaCl_2 определяли следующим образом: клетки *E. coli* JM109 и *K. oxytoca* VN13 суспендировали при 0°C в стерильной деионизованной воде до концентрации $1,8 \cdot 10^9$ и $1,1 \cdot 10^{10}$ кл/мл соответственно, смешивали с ДНК и фасовали по 90 мкл в предварительно охлажденные пла-

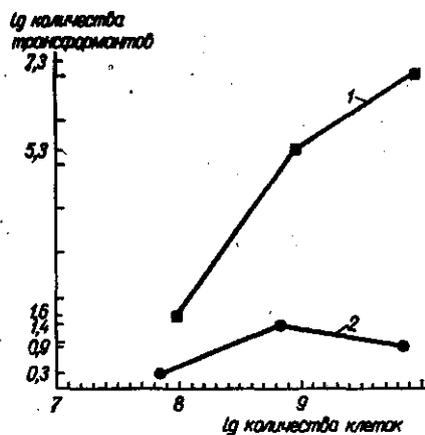


Рис. 2. Влияние концентрации клеток на эффективность трансформации: 1 — *K. oxytoca* VN13; 2 — *E. coli* JM109

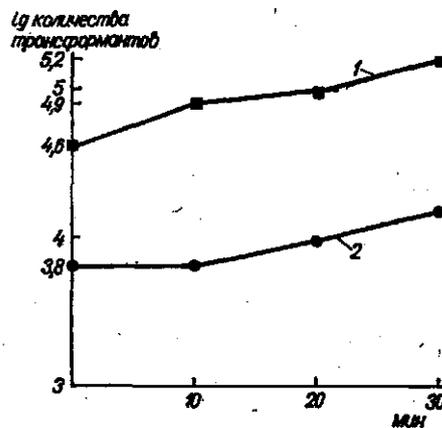


Рис. 3. Влияние инкубации в CaCl_2 до замораживания на эффективность трансформации: 1 — *K. oxytoca* VN13; 2 — *E. coli* JM109

стиковые центрифужные пробирки (1,5 мл). В каждую пробирку добавляли по 10 мкл стоковых 10-кратных растворов CaCl_2 до концентрации 12,5; 25; 50; 75; 100 и 200 мМ. Эффективность трансформации устанавливали после цикла замораживания — оттаивания и 1 ч инкубации в среде LB для экспрессии селективного маркера. Оптимальной для *E. coli* JM109 и *K. oxytoca* VN13 является концентрация CaCl_2 75 мМ.

Влияние дополнительной инкубации в среде LB. Для его определения производили высевы из одной пробирки до и после инкубации в LB в течение 1 ч при 37°C . По нашим данным, такая инкубация увеличивает количество трансформантов в 3—8,7 и 2,5—10 раз соответственно для *K. oxytoca* VN13 и *E. coli* JM109. Это увеличение, по-видимому, является следствием адаптации бактериальных клеток после стрессового воздействия, каковым является цикл замораживания—оттаивания, и того, что за этот период происходит экспрессия селективного маркера.

Влияние концентрации клеток при дополнительной инкубации. Для определения влияния концентрации клеток при дополнительной инкубации после оттаивания суспензии ее разводили в 10 и 100 раз в среде LB и физиологическом растворе, инкубировали разведения 1 ч при 37°C и высевали на селективные чашки. Как при инкубации в LB, так и при инкубации в физиологическом растворе эффективность трансформации увеличивалась в 1,6 и 1,8 раза соответственно для *K. oxytoca* VN13 и *E. coli* JM109 при разведении в 100 раз по сравнению с разведением в 10 раз.

Влияние инкубации в CaCl_2 до замораживания. Результаты, иллюстрирующие влияние инкубации в CaCl_2 до замораживания на эффективность трансформации, представлены на рис. 3. Как можно видеть из этого рисунка, введение в стандартный протокол 30-минутного периода инкубации в CaCl_2 до замораживания увеличивает эффективность трансформации *K. oxytoca* VN13 и *E. coli* JM109 соответственно в 4 и 3 раза.

Влияние маркера, используемого для селекции. *E. coli* JM109 трансформируется плазмидой *pUC4k* по маркеру Ap^r с

частотой, вдвое большей, чем по маркеру Km^r . Мы не располагаем аналогичными данными для штамма *K. oxytoca* VN13 вследствие его природной устойчивости к ампициллину в концентрации свыше 200 мкг/мл.

Влияние температуры замораживания оценивали следующим образом: клетки суспендировали в $CaCl_2$ при 0 °С, смешивали с ДНК, фасовали в предварительно охлажденные до 0 °С стерильные центрифужные пробирки (1,5 мл) и замораживали при соответствующей температуре. После размораживания клетки высевали на селективные чашки.

Влияние температуры замораживания на эффективность трансформации

Режим замораживания	Эффективность трансформации (число трансформантов на 1 мкг ДНК)	
	<i>E. coli</i> JM109	<i>K. oxytoca</i> VN13
—20 °С		
стандартная модификация;		
стандартная модификация+30 мин инкубации в $CaCl_2$	$3,1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$
до замораживания;		
упрощенная модификация	$2,2 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$
	25	$4,3 \cdot 10^5$
—70 °С		
стандартная модификация;		
стандартная модификация+30 мин инкубации в $CaCl_2$	76	$3,6 \cdot 10^5$
до замораживания;		
упрощенная модификация	$1,5 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$
	25	$4,8 \cdot 10^5$

Merrick et al. установили, что температура замораживания практически не оказывает влияния на эффективность трансформации [4]. По нашим данным, глубокое замораживание при —20 и —70 °С в морозильной камере гораздо менее эффективно, чем замораживание в жидком азоте (таблица).

Процедура замораживания — оттаивания, впервые примененная авторами [9] для индукции поглощения фаговой ДНК клетками *E. coli* и *Proteus vulgaris*, является составной частью многих высокоэффективных методик трансформации *E. coli* [10, 11]. Показано, что эта процедура может быть использована для трансформации различных видов *Klebsiella* [4, 12], *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* LR5000 [4] и *Agrobacterium tumefaciens* [13]. Мы успешно использовали описанные нами модификации метода [4] для трансформации *E. coli* JM109, *K. oxytoca* VN13, *E. cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531, *E. carotovora* subsp. *carotovora* ИМВ8351. При этом стандартная модификация, практически равная по эффективности методу Merrick et al. [4], позволяет сократить время, затрачиваемое на трансформацию, с 4—6 до 1 ч. Упрощенная модификация позволяет еще более сократить время (до 5 мин). При этом эффективность трансформации несколько снижается. Описанные модификации чрезвычайно удобны для введения готовых генноинженерных конструкций в клетки различных энтеробактерий и, по-видимому, тех штаммов *Pseudomonas* и *Agrobacterium*, которые могут быть трансформированы методом замораживания — оттаивания.

Summary. Standard and simplified modifications of freeze-thaw method for enterobacteria transformation are described. First enables one to transform *E. coli* JM109 and *K. oxytoca* VN13 within 1 hour with an efficiency of about $2.5 \cdot 10^6$ transformants per microgram of plasmid *pUC4k* DNA. Simplified modification gives an efficiency of $1 \cdot 10^6$ transformants per microgram of *pUC4k* DNA within 5 min. Both modifications were successfully applied for the transformation of *Enterobacteria cloacae*. *E. cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531, *E. carotovora* subsp. *carotovora* IMV8351.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matsumoto H., Tasaki T.* Genetic recombination in *Klebsiella pneumoniae* // *Jap. J. Microbiol.*—1970.—14, N 2.—P. 129—141.
2. *Montgomery 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, Б. 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. 259—268.
8. *Маньятис 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. Pinznava, 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., Okuyama 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.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 17. 09.91