

ТРАНСФОРМАЦІЯ ШТАМА *ESCHERICHIA COLI* C600 ПЛАЗМІДОЮ pKEN, ЩО НЕСЕ ГЕН GFP

В. Ю. Іваніца, Д. В. Сокол, Д. Душенківський, І. І. Маринова, А. Г. Мерліч, М. Б. Галкін, Н. В. Ліманська

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса 65082

Можливість швидкого розпізнавання трансформованих клітин робить застосування гена, що кодує білок GFP (green fluorescent protein), особливо привабливим для прикладної мікробіології, молекулярної біології, вивчення міжмікробних взаємодій тощо. Так званий зелений флуоресцуючий білок було первинно виділено від медузи *Aequorea victoria*. Цей білок абсорбує світло довжиною 395 нм та флуоресцує з максимальною емісією 510 нм [1].

Метою даної роботи було трансформувати клітини безплазмідного штаму *Escherichia coli* C600 плазмідною рKEN, що несе ген GFP.

Плазмідну культуру наступним чином. Добову культуру кишкової палички *Escherichia coli* рKEN розливали по 1 мл у мікропробірки і центрифугували 12 000 об/хв 5 хв. Осаджені клітини промивали 500 мкл розчину 1 (25 мМ Трис-НCl, 10 мМ ЕДТА, 50 мМ глюкози, рН 8,0). Після цього додавали до суміші 200 мкл розчину 2 (0,1 М NaOH, 1% SDS). Інкубували на льоду 3 хв.

Після інкубації додавали 150 мкл розчину 3 (3 М ацетат натрію, рН 4,5) та інкубували на льоду протягом 10 хв. Після інкубації клітини центрифугували 10 хв при 12 000 об/хв. ДНК з супернатанту осаджували 96 ° етанолом та центрифугували 10 хв при 12 000 об/хв. Осад

промивали 70 ° етанолом та випаровували насухо. Підсушений осад плазмідної ДНК розчиняли в 50 мклдистильованої води.

Трансформацію клітин штаму *Escherichiacoli*C600 проводили наступним чином. Культуру вирощували при 37°C на протязі 18 годин. Після інкубації клітини переносили у стерильне середовище LB та інкубували на протязі двох годин при 37°C зі струшуванням (150 об/хв). Культуру центрифугували 5 хв при 12 000 об/хв. Супернатант зливали, а клітини ресуспендували в 1 мл 0,1 МСаCl₂ (охолодженого) та інкубували на льоду 30 хв. Процедуру повторювали двічі. Після інкубації до культури вносили 50 нгплазмідної ДНК та інкубували на льоду упродовж 1 години. Культури поміщали у водяну баню на 60 сек при 42°C та миттєво переносили на лід на дві хвилини. До культури додавали 800 мклLB та інкубували протягом 1,5 годин. Трансформовані клітини висівали на щільне середовище LB з 25 мкг/мл гентаміцину. Чашки інкубували при 37°C добу.

Зтрансформованими клітинами штама*E.coli*C600, що несе ген GFP, проводили дослідження з утворення біоплівки на полістиролових поверхнях (планшети) та на коренях рослин крес-салату. Для цього бактерії штаму культивували добу при 37°C у середовищі LB, а потім витримували трьох денні паростки крес-салату у добовій культурі. У планшети додавали культуру та інкубували добу при 37°C. Надалі проводили фіксацію біоплівки 96° етанолом протягом 15 хв. Підсушували і мікроскопіювали зі збільшенням х900 з використанням червоного світлофільтру. Також фарбували акридиновим оранжевим (0,5% розчин) та розглядалипід світловим мікроскопом (х900).

Проведення експериментальної роботи за вищеописаними методиками дозволило отримати трансформовані клітини штама*E.coli*C600 зплазмідюорKEN. Наявність гена GFP спостерігали за зеленим світінням під люмінісцентним мікроскопом з червоним фільтром. Штам було використано для дослідження здатності клітин кишкової палички до прикріплення на різних поверхнях.

Дослідження біоплівки на скляних поверхнях (предметне скло) та на коренях рослин крес-салату проводили з використанням люмінісцентногомікроскопа. Рівномірне світіння у зеленому спектрі, що вказувало на наявність добре сформованої біоплівки, спостерігалось як на склі, так і на коренях тест-рослин. Це вказувало на здатність штама кишкової палички прикріплюватися до поверхонь рослин. Дослідження препаратів для світлової мікроскопії показало наступні результати. Біоплівки кишкової палички на поверхнях корінців крес-салату були добре розвинутими, але з розривами у структурі. Біоплівки представляли собою мікроколонії бактерій, занурені у матрикс.

Дійсно, згідно даних дослідників, кишкова паличка здатна виживати у ризосфері рослин, потрапляти у внутрішні тканини рослин і таким чином передаватися з продуктами рослинного походження[2]. Виявлено здатність кишкової палички існувати у ризосфері рослин як природний ріст-стимулюючий мікроорганізм [3]. Перспективними є дослідження з виживання кишкових паличок на природних поверхнях.

Література:

1. Morise J.G. Intermolecularenergytransferinthebioluminescent system of *Aequorea* / J. G Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant // Biochemistry. – 1974. – Vol. 13. – P. 2656 – 2662.
2. Nautiyal C. S. Environmental *Escherichia coli* occur as natural plant growth-promoting soil bacterium / C. S Nautiyal, A. Rehman, P. S. Chauhan // Arch Microbiol. – 2010. – Vol. 192. – P. 185 – 193.
3. Solomon E. B. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization / E. B Solomon, S Yaron, K. R. Matthews // Appl Environ Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – P. 397 – 400.