

Object and research methods. The object of the study was the biomass yield of *T. viride* KMB-F-15 depending on the composition of the nutrient medium and the fungistatic activity of the fungal culture filtrate against the phytopathogen *Fusarium culmorum* IMB-F-50716. Sucrose, glucose, fructose, maltose, glycerine, green molasses and corn extract at a concentration of 20 g/l were used as carbon sources, and yeast autolysate, corn extract, sodium nitrate, potassium nitrate, ammonium sulphate, ammonium chloride, ammonium nitrate, L-glutamic acid and arginine hydrochloride were used as nitrogen sources in a concentration of 5 g/l. The influence of the composition of the nutrient medium on the growth of *Trichoderma* was assessed by the yield of dry biomass using the weight method. Fungistatic activity was determined by the level of growth inhibition of *F. culmorum* on a dense nutrient medium by adding the filtrate of the *T. viride* culture liquid.

Results. It was found that glycerine and green molasses resulted in the highest biomass yield of *T. viride* KMB-F-15 (5.0 g/l and 4.9 g/l, respectively). Determination of the fungistatic activity of filtrates of culture liquids obtained from nutrient media with different carbon sources showed that the growth inhibition of *F. culmorum* IMB-F-50716 compared to the control on 3rd day was in the range of 55.9-70% and reached 94.7-100% on 6th day. However, no significant difference was found between the mean values of the experiments using different carbon sources. The most favourable nitrogen sources were yeast autolysate, in which the yield of dry biomass was 4.4 g/l and ammonium chloride (3.3 g/l). The fungistatic activity of *T. viride* KMB-F-15 depends on the source of nitrogen nutrition. The highest percentage of phytopathogen growth inhibition was observed when cultivated in a medium with organic nitrogen sources: maize extract, yeast autolysate, or L-glutamic acid (growth inhibition of 48.4-58.7% and 97.8-100% at 3 and 6 days, respectively). Among the inorganic nitrogen sources, ammonium chloride and ammonium sulphate contributed to the manifestation of fungistatic activity (65.9% and 68.8% on the 3rd day, 94% and 88.5% on the 6th day, respectively).

Conclusions. For submerged cultivation of *T. viride* KMB-F-15 aimed at obtaining a biocontrol agent against phytopathogenic fungi, it is advisable to use glycerol or green syrup as a carbon source and yeast autolysate or ammonium chloride as a nitrogen source, which ensure high biomass yield and a high level of fungistatic activity.

Key words: *Trichoderma*, submerged cultivation, accumulation of biomass, antagonistic properties, phytopathogenic fungi.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Drehval O. A.: <https://orcid.org/0000-0002-0560-5514> ^{DE}

Lesychna A. V.: <https://orcid.org/0009-0007-2710-1636> ^{BD}

Drehval I. V.: <https://orcid.org/0000-0001-6272-2082> ^{CD}

Sklyar T. V.: <https://orcid.org/0000-0003-0224-2460> ^{AF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors of the article confirm that they have no conflict of interest. / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Drehval Igor Volodymyrovych / Дрегваль Ігор Володимирович

Oles Honchar Dnipro National University

Ukraine, 49000, Dnipro, 9 Naukova str. / Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Наукова 9

Tel.: +380677566537 / Тел.: +380677566537

E-mail: dregigor24@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті

Received 20.09.2023 / Стаття надійшла 20.09.2023 року

Accepted 01.03.2024 / Стаття прийнята до друку 01.03.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-371-380

UDC 579.2

Sklyar T. V., Bohatova O. D., Gavryliuk V. G., Lavrentieva K. V., Kurahina N. V.

GENETIC TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* CELLS WITH DIFFERENT DEGREES OF COMPETENCE WITH R-PLASMIDS

Oles Honchar Dnipro National University (Dnipro, Ukraine)

microviro@ukr.net

This work investigates various methods of obtaining competent cells for transforming bacteria with plasmid DNA. The ability to transform is determined by the degree of competence of microbial cells, and the ability to transfer plasmids that contain resistance determinants is an important factor for the acquisition of selective advantages by individual cells in a population of microorganisms. Many species of bacteria lack natural competence or show it at a low level, but they can also be transformed under the action of certain physical and chemical inducers. Therefore, it was

proposed to conduct a comparative analysis of the frequency of transformation of *Escherichia coli* cells of XL1-Blue and 906 strains of different degrees of competence with plasmids with antibiotic resistance determinants: pSBbi-RN (RN) with the ampicillin resistance gene and mCherry-Mito-7 (mCherry) with the resistance gene to kanamycin. The frequency of transformation of *E. coli* cells of strains XL1-Blue and 906 with mCherry and RN plasmids was evaluated. It was found that for competent *E. coli* XL1-Blue cells, the transformation frequency was 3×10^2 CFU/ μ g DNA and 2.5×10^2 CFU/ μ g DNA, respectively, and for *E. coli* strain 906 – 2.8×10^2 CFU/ μ g DNA and 2×10^2 CFU/ μ g DNA. The efficiency of transformation by plasmids of incompetent cells of the studied *E. coli* strains was equal to 0. Supercompetent cells obtained by the Inoue method showed a high efficiency of transformation, which was $(1-2) \times 10^5$ CFU/ μ g DNA for *E. coli* XL1-Blue and $(1-15) \times 10^5$ CFU/ μ g DNA for *E. coli* 906. The obtained data from electrophoresis in agarose gel indicate successful transfer of plasmids during transformation into bacterial cells.

Key words: genetic transformation, antibiotic resistance plasmids, competent cells, supercompetent cells.

Connection of the publication with planned research works.

This work is a fragment of SRW: «Antagonistic and synergistic relationships in microbial associations» (state registration number – 0122U001456).

Introduction.

The problem of increasing the number and intensive circulation of antibiotic-resistant variants of microorganisms is determined by the possibility of transferring extrachromosomal genetic elements – plasmids, which are transmitted with a high frequency in populations of microorganisms as a result of transformation [1]. The ability to transform is determined by the degree of competence of microbial cells. Many types of bacteria lack natural competence or show it at a low level, but they can also be transformed under the action of certain physical and chemical inducers [2]. Only some species of bacteria, such as *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* or *Neisseria gonorrhoeae*, show natural competence. In many species of bacteria, competence appears or remains at a high level only at a certain stage of culture growth. Competence develops as cells begin to grow and reaches its maximum during early and late log phase in *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii*, *Streptococcus pneumoniae* and *Anacystis nidulans* R2 during the transition from log phase to plateau, as seen in *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *Chlorobium limicola*, *Pseudomonas stutzeri* and *Vibrio* spp. [3-11]. In *Agmenellum quadruplicatum*, *Deinococcus (Micrococcus) radiodurans*, and *Mycobacterium smegmatis*, competence continues during exponential growth and decreases during the stationary phase [12-14].

However, many species of bacteria lack natural competence or show it at a low level, but they can also be transformed under the action of certain physical and chemical inducers. *Escherichia coli* is not a naturally competent bacterium, but artificial competence can be achieved by treatment with calcium chloride and subsequent heat shock [15].

It is known that various factors of a physicochemical nature, such as temperature shock, calcium, manganese ions, electric current, etc., serve as inducers of increased competence in various types of microorganisms. Low-temperature shock can influence changes in porin expression, block antibiotic uptake in *Moraxella catarrhalis* and develop adaptive resistance to β -lactam antibiotics [16]. The bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* increases the size of outer membrane porins to maintain internal pH, which also affects antibiotic resistance. With the onset of starvation, the regulatory response leads to enhanced expression of certain

metabolic genes. For example, an increased level of glutamine synthetase appears in *E. coli* and *Salmonella typhimurium* due to nitrogen limitation [17]. The totality of currently known information indicates that genetic transformation greatly influences the dynamics of the bacterial population and the evolution and speciation of microorganisms [18].

In connection with the variety of conditions affecting the competence and transformation of bacterial cells, and, as a result, their antibiotic resistance, the question of studying the dependence of the implementation of mechanisms of genetic recombination in populations of microorganisms on the environmental factors of the natural and artificial environment remains relevant.

The aim of the study.

Carrying out a comparative analysis of the frequency of transformation of *Escherichia coli* cells of different degrees of competence by plasmids with antibiotic resistance determinants.

Object and research methods.

The research materials were *E. coli* XL1-Blue strains with a tetracycline resistance determinant and the clinical laboratory *E. coli* 906 strain, plasmid pSBbi-RN (RN) with genes for antibiotic resistance to ampicillin and mCherry-Mito-7 (mCherry) – to kanamycin.

During the experiment, a number of nutrient media were used for transformation: LM, SOB, and SOC media. Solutions and buffers were used to perform the experiment: TFB, FSB, DMSO and dithiothreitol (DTT) solution.

To obtain competent cells, *E. coli* culture was first cultivated on LM medium for no more than 24 hours at 37°C. After that, several colonies were transferred to flasks with SOB medium and cultivated until reaching an optical density of $OD_{600} = 0.6$. Next, the cultures were centrifuged and resuspended by adding DMSO to 3.5% and frozen at -70°C. Bacteria were cultured in SOB to a cell density of $1-2 \times 10^8$ CFU/ml, diluted with glycerol in a ratio of 1:1 and frozen at -70°C. On the eve of transformation, cells were seeded on LM medium at 37°C for 24 hours.

Transformation of *E. coli* cells was performed using the Hanahan method, which used colonies from frozen cell stock. Cells were cultured in SOB until a density of $4 \times 10^7 - 7 \times 10^7$ / ml was reached, after which centrifugation and resuspension in TFB were performed. DMSO and DTT were added and incubated on ice, after which 1 μ l of DNA was added and incubated at 42°C for 2 min. After the addition of the SOC medium, they were incubated at 37°C and then sown on a nutrient medium with kanamycin (50 μ g/ml) in the case of mCherry plasmid transformation and on a nutrient medium with ampicil-

lin (50 µg/ml) in the case of pSBbi-RN transformation and incubated at 37°C.

To obtain competent cells by the Inoue method, several modifications were made to the Hanahan method: cultivation was carried out at a temperature of 18°C to $OD_{600} = 0.3-0.4$; all salts except KCl, $CaCl_2$, $MnCl_2$ and potassium acetate were removed from FTB; hexamine cobalt chloride, $CoSO_4$, LiCl and RbCl were removed from the transformation buffer; the mixture of cells was incubated at 42°C for 30 seconds [19].

The frequency of transformation was determined by the formula: $N=n*a/b/1 \mu g$ of DNA, where n is the number of colonies grown on a nutrient medium with the appropriate antibiotic; a – volume of cell suspension; b – degree of dilution.

Plasmid DNA was isolated by alkaline lysis method [20]. To do this, bacterial cultures were grown on a solid nutrient medium at an optimal temperature (37°C) for a day. A 2-3 mm colony was carefully resuspended in 100 µl of TAE buffer (40 mM Tris-acetate, pH 7.9; 2 mM sodium EDTA). A double volume (200 µl) of lysis buffer (3% SDS; 50 mM Tris, pH 12.6) was added to the obtained suspension. The samples were incubated at 58 °C for 60 min. The same volume (300 µl) of a mixture of acidic phenol and chloroform (1:1) was added to the resulting lysate. It was gently mixed until a homogeneous suspension was formed and centrifuged on an ELMI microcentrifuge at 11,000 rpm for 5 min. Centrifugation was carried out two or three times (if necessary) for better separation of phases, alternating with mixing. The upper aqueous phase, where the plasmid DNA was located, was taken. The obtained DNA samples were analyzed using agarose gel electrophoresis.

DNA was electrophoretically separated in horizontal agarose gels with an agarose concentration of 1% and in TAE buffer. The electric field strength was 6-8 V/cm. The separation time was 3-5 hours. After electrophoresis, the gel plate was stained with ethidium bromide (1 µg/ml). To visualize the DNA, the gel was viewed under direct ultraviolet light and photographed.

Research results and their discussion.

This work is aimed at analyzing and comparing the frequency of transformation of competent, ultracompetent and incompetent *E. coli* cells with plasmids containing antibiotic resistance determinants. The *E. coli* XL1-Blue strain, which has a tetracycline resistance gene located in the chromosome, was used for the transformation. Cells of the *E. coli* 906 strain, which do not contain the coding gene for antibiotic resistance, were also used. Physical and chemical methods are used to increase the number of pores in the cell membranes for the acquisition of competence by bacterial cells. The transforming factors were two plasmids: mCherry containing the kanamycin resistance gene and RN with the ampicillin resistance gene (table 1).

The conducted experiments confirmed the high ability of competent cells of the strain *E. coli* XL1-Blue for genetic recombination. The efficiency of transformation of competent cells of the *E. coli* XL1-Blue strain with the mCherry plasmid was the highest, reaching a frequency of 3×10^2 CFU/µg of DNA. When using the RN plasmid to transform cells of the same strain of competent cells, 2.5×10^2 CFU/µg of DNA were obtained. The indicator strain *E. coli* 906 gives results that indicate a lower efficiency of genetic recombination compared to the

Table 1 – Frequency of transformation of competent cells of *E. coli* XL1-Blue and 906 strains obtained by Hanahan's method

<i>E. coli</i> strain / plasmids	Transformation frequency, CFU/1 µg DNA
XL1-Blue / mCherry	3×10^2
XL1-Blue / RN	2.5×10^2
906 / mCherry	2.8×10^2
906 / RN	2×10^2

competent cells of strain *E. coli* XL1-Blue. The *E. coli* 906 strain transformed with the mCherry plasmid showed a transformation frequency of 2.8×10^2 CFU/µg DNA, while the use of the RN plasmid resulted in a transformation frequency of 2×10^2 CFU/µg DNA.

Incompetent cells of *E. coli* XL1-Blue and RN strains were incapable of genetic recombination – transformants were not formed.

The Inoue method was used to increase the frequency of transformation. The Inoue method is used to increase competence and obtain supercompetent cells, and the bacterial culture itself is grown at 18°C. As a result, we significantly increased the transformation frequency (table 2). The highest efficiency of transforming supercompetent cells of strain *E. coli* 906 with mCherry plasmid was 15×10^5 CFU/µg of DNA. The ability for genetic recombination of supercompetent cells of the same strain with the RN plasmid was 1×10^5 CFU/µg DNA.

To confirm the transfer of plasmids into the recipient strains, plasmid DNA was isolated, and the isolated nucleic acids were electrophoretically separated in an agarose gel.

As can be seen from figure 1, incompetent cells of *E. coli* XL1-Blue and *E. coli* 906 strains (lanes 2 and 3) do not contain plasmid DNA. Competent cells obtained by the Hanahan method and transformed with mCherry and RN plasmid DNA contain the corresponding plasmids (lanes 4, 5 and 7, 8).

Plasmid DNA was also isolated from *E. coli* XL1-Blue and *E. coli* 906 transformant cells obtained by the Inou method (supercompetent) and transformed with RN and mCherry plasmids and electrophoretically separated in an agarose gel. In general, electrophoresis confirmed the presence of plasmids in transformant cells (fig. 2). It should also be noted that the time of plasmid separation in this case was somewhat longer – 3

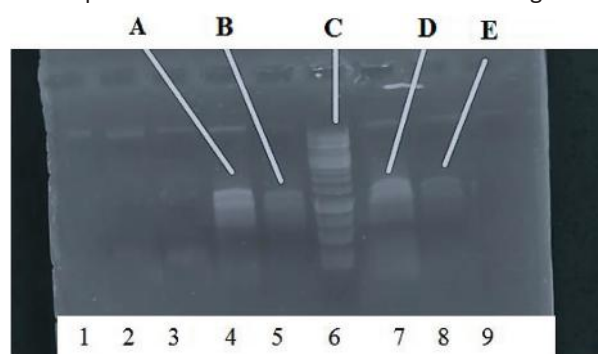


Figure 1 – Electrophorogram of plasmid DNA products isolated from transformant clones obtained by Hanahan's method:
A – *E. coli* XL1-Blue(mCherry), B – *E. coli* 906 (mCherry), C – molecular mass marker, D – *E. coli* XL1-Blue(RN), E – *E. coli* 906 (RN). Lanes 1-3 and 9 – control, incompetent plasmid-free strains (*E. coli* C600, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* 906, respectively), 4, 5 and 7, 8 – transformant clones.

Table 2 – Frequency of transformation of supercompetent cells of *E. coli* XL1-Blue and 906 strains according to Inoue's method

E. coli strain / plasmids	Transformation frequency, CFU/1 µg DNA
XL1-Blue / mCherry	2×10^5
XL1-Blue / RN	1×10^5
906 / mCherry	15×10^5
906 / RN	1×10^5

hours. Therefore, barely noticeable minor tracks of the MCherry plasmid, which were visible in **figure 1** (lanes 4 and 5).

Green, M. R., and Sambrook, J. report that under standard laboratory conditions, typical transformation efficiencies range from 1×10^8 to 3×10^8 CFU/µg for *E. coli* [19]. According to the research of scientists Yang, Y., Liu, M., Wang, T. and others, the transformation frequency results were obtained using the TSS-HI competence method, which is optimized using the Hanahan and Inoue methods. *E. coli* strain BW25113 and its derived strains acquired competence and were transformed with plasmids carrying genes for resistance to ampicillin, spectinomycin, chloramphenicol and apramycin. The efficiency of transformation according to these methods is approximately 7×10^9 CFU/µg [21].

Authors Torres-Cortés G., Garcia B.J., Compant S. and others used Inoue's method for *E. coli* strain MFD-pir to transform bacteria with plasmids pEX18Tc-Δhcp and pEX18Tc-ΔtssB. Plasmids were transferred into the bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 by conjugation in order to study the proteins Hcp and TssB, which are important for inhibiting the growth of the phytopathogenic bacterium Xcc8004. To determine transformants, bacteria were sown on medium with tetracycline [22].

In the context of the results on the transformation of supercompetent cells of the strain *Escherichia coli* XL1-Blue with the plasmid pSBbi-RN (RN) using the Inoue method, it is appropriate to mention the following. According to Heydenreich, F.M., Miljuš, T., Jaussi, R. and others, the efficiency of genetic recombination of supercompetent cells of *E. coli* strain XL1-Blue, obtained by the Inoue method, when transformed with plasmid pBR322, which contains antibiotic resistance genes to ampicillin and tetracycline, is at least 1×10^7 CFU/µg. pBR322 has a higher transformation efficiency than RN. An alternative to using pBR322 is pUC19 plasmids are modified pBR322 vectors. Plasmid pSBbi-RN (RN) used

in the experiment has a pUC19 vector backbone. Both plasmids carry genes for ampicillin resistance (Amp^R), but pBR322 also contains a tetracycline resistance gene (tet^R). The main difference between pBR322 and pSBbi-RN is their size: pBR322 is a 4361 bp plasmid vector, while pUC19 is a 2021 bp plasmid vector. [23].

According to the research of the authors Thomas Fryer, Darian S. Wolff, View Max D. Overath and others, the efficiency of chemical transformation and electroporation of *E. coli* XL1-Blue with the plasmid PF-Nbb102-CAM, presented as a circular supercoiled plasmid, a relaxed circular plasmid, assembled by the Golden Gate method and linear DNA, which was obtained as a result of RCA nickase treatment. Plasmid PF-Nbb102-CAM has genes for resistance to chloramphenicol and encodes VHH. They found that chemically competent cells were more efficiently transformed by linear DNA, and electrocompetent cells by relaxing circular DNA. As a result of this observation, the researchers studied various parameters related to the chemical transformation. In addition, they explored the potential scalability of chemical transformation performed in parallel on multiple samples and the use of increased cell volumes. The authors found that the most effective approach involved using a modified Inoue protocol [24].

In a study by Khasanah A.U., Putri W.A., Rahayu H.M. and other *E. coli* BL21 cells were transformed with the antibiotic-resistant plasmid pET-28c, which contains the merA gene from *Streptomyces* AS2. Competent *E. coli* BL21 cells were obtained using the Inoue method. Plasmid pET-28c is used for protein expression in bacteria, particularly in *E. coli*. In addition, pET-28c contains a gene for resistance to the antibiotic kanamycin, and the merA gene encodes a protein that helps reduce mercury toxicity. After heat shock transformation, cells were selected using the antibiotic kanamycin, which was present in the medium to select cells that had successfully taken up the plasmid. According to the provided data, a positive result was obtained after transforming the merA gene into *E. coli* BL21 cells. This was confirmed by the ability of the isolates to grow on selective LB medium with kanamycin (20 µg/ml) and the formation of approximately 40 colonies after incubation for 24 hours at 37°C. This positive result indicates the ability of the plasmid to produce target proteins [25].

Vamsi Bharadwaj, S. V., Tiwari, D. S., Ghosh, T. et al. introduced plasmid pSYN_1-DTT1-RFP and plasmid pSYN_1-DTT2-RFP into *E. coli* DH5α, which had been rendered competent by the Inoue method. These plasmids have genes for resistance to the antibiotic streptomycin, so transformants were selected by sowing in a medium with an antibiotic. The resulting transformants were grown on a selective medium at different temperatures to assess the effect of the temperature factor on the expression of RFP (red fluorescent protein) in recombinants [26].

Inoue's method was also used in many *E. coli* DH5α cells studies to obtain protein and clone plasmids. Bhat, S., Banerjee, A., and Alagesan, S. *E. coli* DH5α was used for cloning and propagating plasmids such as pTargetF_g1_HA and pTargetF_g2_HA. *E. coli* DH5α cells transformed with pTargetF_g1_HA and pTargetF_g2_HA plasmids were selected on a selective medium with the antibiotic spectinomycin, since these plasmids were created based on the pTargetF plasmid, which has a spec-

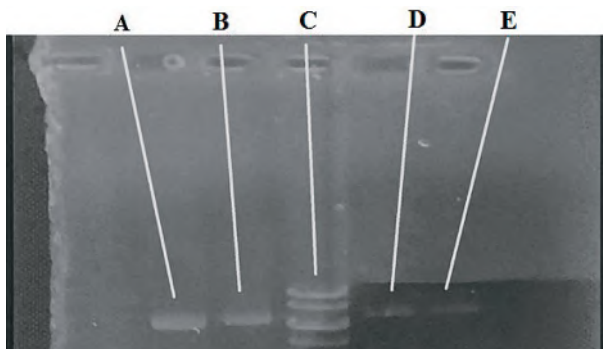


Figure 2 – Electrophorogram of plasmid DNA products isolated from transformant clones obtained by the Inoue method: A – *E. coli* XL1-Blue(mCherry), B – *E. coli* 906(mCherry), C – molecular mass marker, D – *E. coli* XL1-Blue(RN), E – *E. coli* 906(RN).

tinomycin resistance determinant. Later, plasmids were used to delete the *araC* gene in the bacterium *E. coli* MG1655 for further genetic engineering [27].

According to the results of the research of scientists Lemay-St-Denis, C., Diwan, S. S. and Pelletier, J. N. on the transformation of competent cells of the *E. coli* DH5 α strain with plasmids *dfrB10*-pET24 and *dfrB11*-pET24, recombinants were obtained, which were selected for the marker of resistance to kanamycin. Later, the transformants were used as protein producers due to the expression of the *DfrB10* and *DfrB11* genes [28].

Conclusions.

The frequency of transformation of *E. coli* cells brought to the state of competence and incompetent cells was studied. The frequency of transformation of competent *E. coli* XL1-Blue cells with mCherry plasmids with a kanamycin resistance determinant and RN with an ampicillin resistance determinant was determined, which was 3×10^2 CFU/ μ g DNA and 2.5×10^2 CFU/ μ g DNA, respectively. When transforming competent *E. coli* 906 cells with the same plasmids, the frequency of obtaining recombinants was 2.8×10^2 CFU/ μ g DNA and 2×10^2 CFU/

μ g DNA, respectively. The efficiency of plasmid transformation of incompetent cells of the studied *E. coli* strains was equal to 0.

A high frequency of transformation by R-plasmids of supercompetent *E. coli* cells of strains XL1-Blue and 906, obtained by Inoue's method, was established, which was equal to $(1-2) \times 10^5$ CFU/ μ g DNA and $(1-15) \times 10^5$ CFU/ μ g DNA, respectively. The obtained data on the presence of nucleic acids of plasmid origin on agarose gel after electrophoresis confirm the fact of transformation of supercompetent cells of *E. coli* strains XL1-Blue and 906 with mCherry and RN plasmids.

Prospects for further research.

The research results can be used for monitoring and qualitative analysis of the transformation of bacteria with plasmids carrying antibiotic-resistance genes. This may open up new opportunities for developing strategies to control antibiotic-resistant bacteria and preserve the effectiveness of antibiotics. The research can also be useful for the further development of molecular biology, biotechnology, and genetic engineering.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-371-380

УДК 579.2

Скляр Т. В., Богатова О. Д., Гаврилюк В. Г., Лаврентьєва К. В., Курагіна Н. В.

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ R-ПЛАЗМІДАМИ КЛІТИН РІЗНОГО СТУПЕНЮ КОМПЕТЕНТНОСТІ *ESCHERICHIA COLI*

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (м. Дніпро, Україна)

microviro@ukr.net

У даній роботі досліджено різні способи отримання компетентних клітин для трансформації бактерій плазмідною ДНК. Здатність до трансформації визначається ступенем компетентності мікробних клітин, а здатність до переносу плазмід, які містять детермінанти резистентності є важливим фактором для набуття селективних переваг окремими клітинами в популяції мікроорганізмів. Існує багато видів бактерій, у яких відсутня природна компетентність або її прояв знаходиться на низькому рівні, але вони також можуть бути трансформовані під дією певних фізичних та хімічних індукторів. Тому було запропоновано провести порівняльний аналіз частоти трансформації клітин *Escherichia coli* штамів XL1-Blue та 906 різного ступеню компетентності плазмідами з детермінантами стійкості до антибіотиків: *pSBbi-RN* (RN) з геном стійкості до ампіциліну та *mCherry-Mito-7* (mCherry) з геном стійкості до канаміцину. Була проведена оцінка частоти трансформації клітин *E. coli* штамів XL1-Blue та 906 плазмідами mCherry та RN. Виявлено, що для компетентних клітин *E. coli* XL1-Blue частота трансформації складала відповідно 3×10^2 КУО/мкг ДНК та $2,5 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК, а для штаму *E. coli* 906 – $2,8 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК та 2×10^2 КУО/мкг ДНК. Ефективність трансформації плазмідами некомпетентних клітин досліджуваних штамів *E. coli* дорівнювала 0. Суперкомпетентні клітини отримані методом Іноу виявили високу ефективність трансформації, яка складала $(1-2) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК для *E. coli* XL1-Blue та $(1-15) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК для *E. coli* 906. Отримані дані з електрофорезу в агарозному гелі свідчать про успішний перенос плазмід під час трансформації у бактеріальні клітини.

Ключові слова: генетична трансформація, плазміди антибіотикорезистентності, компетентні клітини, суперкомпетентні клітини.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дана робота є фрагментом НДР: «Антагоністичні та синергетичні взаємовідносини в мікробних асоціаціях» (державний реєстраційний номер – 0122U001456).

Вступ.

Проблема збільшення кількості та інтенсивної циркуляції стійких до антибіотиків варіантів мікроорганізмів обумовлюється можливістю передачі позахромосомних генетичних елементів — плазмід,

які передаються з високою частотою в популяціях мікроорганізмів в результаті трансформації [1]. Здатність до трансформації обумовлена ступенем компетентності мікробних клітин. Існує багато видів бактерій, у яких відсутня природна компетентність або її прояв знаходиться на низькому рівні, але вони також можуть бути трансформовані під дією певних фізичних та хімічних індукторів [2]. Лише деякі види бактерій, наприклад, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* або *Neisseria gonorrhoeae* демонструють природну компетентність. У багатьох видів бактерій

компетентність виникає або залишається на високому рівні лише на певному етапі росту культури. Компетентність розвивається в міру того, як клітини починають рости і досягають свого максимуму протягом ранньої та пізньої логарифмічної фази у *Acinetobacter calcoaceticus*, *Azotobacter vinelandii*, *Streptococcus pneumoniae* та *Anacystis nidulans* R2 під час переходу з логарифмічної фази до плато, як це спостерігається у *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *Chlorobium limicola*, *Pseudomonas stutzeri* та *Vibrio* spp. [3-11]. У *Agmenellum quadruplicatum*, *Deinococcus (Micrococcus) radiodurans* та *Mycobacterium smegmatis* компетентність триває впродовж експоненційного росту та знижується протягом стаціонарної фази [12-14].

Однак існує багато видів бактерій, у яких відсутня природна компетентність або її прояв знаходиться на низькому рівні, але вони також можуть бути трансформовані під дією певних фізичних та хімічних індукторів. *Escherichia coli* не є природно компетентною бактерією, однак за допомогою обробки хлоридом кальцію та подальшого теплового шоку можна досягти штучної компетентності [15].

Відомо, що різні чинники фізико-хімічної природи, такі як температурний шок, іони кальцію, мангану, електричний струм тощо слугують індукторами підвищення компетентності у різних видів мікроорганізмів. Шок низької температури може впливати на зміну експресії порину, блокувати надходження антибіотиків у *Moraxella catarrhalis* та розвивати адаптивну резистентність до β -лактамних антибіотиків [16]. Бактерія *Acidithiobacillus ferrooxidans* збільшує розмір поринів зовнішньої мембрани для підтримки внутрішнього рН, що так само впливає на стійкість до антибіотиків. З початком голодування регуляторна реакція призводить до посиленої експресії певних метаболічних генів. Наприклад, підвищений рівень глутамінсинтетази з'являється в *E. coli* та *Salmonella typhimurium* як наслідок обмеження вмісту азоту [17]. Сукупність відомої в даний час інформації свідчить про те, що генетична трансформація має великий вплив на динаміку популяції бактерій, а також на еволюцію та видоутворення мікроорганізмів [18].

У зв'язку з різноманітністю умов, що впливають на компетентність та трансформацію бактеріальних клітин, і, як наслідок, на їхню антибіотикорезистентність, актуальними залишаються питання вивчення залежності реалізації механізмів генетичної рекомбінації в популяціях мікроорганізмів від факторів довкілля природного й штучного оточення.

Мета дослідження.

Проведення порівняльного аналізу частоти трансформації клітин *Escherichia coli* різного ступеню компетентності плазмідами з детермінантами стійкості до антибіотиків.

Об'єкт і методи дослідження.

Матеріалами дослідження слугували штами *E. coli* XL1-Blue з детермінантою резистентності до тетрацикліну та клінічний лабораторний штам *E. coli* 906, плазміда pSBbi-RN (RN) з генами антибіотикостійкості до ампіциліну та mCherry-Mito-7 (mCherry) – до канаміцину.

У ході експерименту для трансформації використовували ряд поживних середовищ: середовище LM,

SOB та SOC. Для виконання експерименту використовували розчини та буфери: TFB, FSB, DMSO і розчин дитиотреїтолу (DTT).

Для отримання компетентних клітин культуру *E. coli* культивували спочатку на LM-середовищі протягом не більше 24 годин при 37°C. Після цього кілька колоній переносили у колби з середовищем SOB та культивували до досягнення оптичної щільності $OD_{600}=0,6$. Далі центрифугували та ресуспендували культури, додавши DMSO до 3.5%, і заморозили при -70°C. Бактерії культивували у SOB до щільності клітин $1-2 \times 10^8$ КУО/мл, розводили гліцеролом у співвідношенні 1:1 та заморожували при -70°C. Напередодні трансформації клітини висівали на середовищі LM при 37°C протягом 24 годин.

Трансформацію клітин *E. coli* проводили методом Ханахана, використовуючи колонії зі замороженого запасу клітин. Клітини культивували у SOB до досягнення щільності $4 \times 10^7 - 7 \times 10^7$ / мл, після чого проводили центрифугування та ресуспендування в TFB. Додавали DMSO та DTT, інкубували на льоду, після чого додавали 1 мкл ДНК та інкубували при 42°C 2 хв. Після додавання середовища SOC інкубували при 37°C, а потім висівали на поживне середовище з канаміцином (50 мкг/мл) у випадку трансформації плазмідною mCherry та на поживне середовище з ампіциліном (50 мкг/мл) – у випадку трансформації pSBbi-RN та інкубували при 37°C.

Для отримання компетентних клітин методом Іноу було внесено ряд модифікацій до методу Ханахана: культивування проводилось за температури 18°C до $OD_{600} = 0,3-0,4$; з FTB були вилучені усі солі, крім KCl, $CaCl_2$, $MnCl_2$ та ацетату калію; з буфера трансформації вилучено гексамін кобальт хлорид, $CoSO_4$, LiCl та RbCl; суміш клітин інкубували при 42°C протягом 30 секунд [19].

Частоту трансформації визначали за формулою: $N=n \cdot a \cdot b / 1$ мкг ДНК, де n – кількість колоній, виростили на поживному середовищі з відповідним антибіотиком; a – об'єм суспензії клітин; b – ступінь розведення.

Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису [20]. Для цього культури бактерій вирощували на твердому поживному середовищі при оптимальній температурі (37°C) протягом доби. Колонію розміром 2-3 мм ретельно ресуспендували в 100 мкл буфера TAE (40 mM Tris-acetate, pH 7.9; 2 mM sodium EDTA). До отриманої суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буферу (3% SDS; 50mM Tris, pH 12.6). Зразки інкубували при 58 °C протягом 60 хв. До отриманого лізату додавали такий самий об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення гомогенної суспензії та центрифугували на мікроцентрифузі ELM1 при 11000 об/хв, 5 хв. Для кращого розділення фаз центрифугування проводили двічі або тричі (за потреби), чергуючи з перемішуванням. Відбирали верхню водну фазу, де знаходилася плазмідна ДНК. Отримані зразки ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

Електрофоретичне розділення ДНК проводили у горизонтальних агарозних гелях з концентрацією агарози 1% та в буфері TAE. Напруженість електричного поля становила 6 – 8 В/см. Час розділення – 3-5 год. Після електрофорезу гелеву пластинку фарбува-

ли бромідом етидію (1 мкг/мл). Для візуалізації ДНК гель переглядали при прямому ультрафіолетовому освітленні та фотографували.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дана робота спрямована на аналіз та порівняння частоти трансформації компетентних, ультракомпетентних та некомпетентних клітин *E. coli* плазмідами, що містять детермінанти стійкості до антибіотиків. Для проведення трансформації використано штам *E. coli* XL1-Blue, що має ген резистентності до тетрацикліну, розташований в хромосомі. Також використовували клітини штаму *E. coli* 906, що не містять кодуєчого гену стійкості до антибіотиків. Для набуття компетентності бактеріальними клітинами застосовано фізичні та хімічні методи з метою збільшення кількості пор в мембранах клітин. Трансформуючими факторами виступали дві плазмиди: mCherry, що містить ген стійкості до канаміцину, та RN з геном стійкості до ампіциліну (табл. 1).

Проведені експерименти підтвердили високу здатність компетентних клітин штаму *E. coli* XL1-Blue до генетичної рекомбінації. Ефективність трансформації компетентних клітин штаму *E. coli* XL1-Blue плазмідною mCherry була найвищою, досягаючи частоти 3×10^2 КУО/мкг ДНК. При використанні плазмиди RN для трансформації клітин цього ж штаму компетентних клітин було отримано $2,5 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК. Індикаторний штам *E. coli* 906 дає результати, які вказують на нижчу ефективність генетичної рекомбінації порівняно з компетентними клітинами штаму *E. coli* XL1-Blue. Штам *E. coli* 906, трансформований плазмідною mCherry, продемонстрував частоту трансформації $2,8 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК, в той час як використання плазмиди RN призвело до частоти трансформації 2×10^2 КУО/мкг ДНК.

Некомпетентні клітин штамів *E. coli* XL1-Blue та RN до генетичної рекомбінації не були здатними – трансформанти не утворювались.

Для підвищення частоти трансформації було використано метод Іноу. Метод Іноу застосовують для підвищення компетентності та отримання суперкомпетентних клітин, а саму бактеріальну культуру вирощують при 18°C. В результаті нам вдалось значно збільшити частоту трансформації (табл. 2). Найвищою була ефективність трансформації суперкомпетентних клітин штаму *E. coli* 906 плазмідною mCherry – 15×10^5 КУО/мкг ДНК. Здатність до генетичної рекомбінації суперкомпетентних клітин цього ж штаму плазмідною RN складала 1×10^5 КУО/мкг ДНК.

Для підтвердження переносу плазмід в штам-реципієнти виділяли плазмідну ДНК та проводили електрофоретичне розділення виділених нуклеїнових кислот в агарозному гелі.

Як видно з **рисунку 1**, некомпетентні клітин штамів *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* 906 (доріжки 2 та 3) не містять плазмідних ДНК. Компетентні клітини, отримані методом Ханахана, та трансформовані плазмідними ДНК mCherry та RN, містять відповідні плазмиди (доріжки 4, 5 та 7, 8).

З клітин-трансформантів штамів *E. coli* XL1-Blue та *E. coli* 906, отриманих методом Іноу (суперкомпетентних) та трансформованих плазмідами RN та mCherry, також виділили плазмідну ДНК та провели її електрофоретичне розділення в агарозному гелі.

Таблиця 1 – Частота трансформації компетентних клітин штамів *E. coli* XL1-Blue і 906, отриманих методом Ханахана

Штам <i>E. coli</i> / плазмиди	Частота трансформації, КУО/1 мкг ДНК
XL1-Blue / mCherry	3×10^2
XL1-Blue / RN	$2,5 \times 10^2$
906 / mCherry	$2,8 \times 10^2$
906 / RN	2×10^2

Загалом, електрофорез підтвердив наявність плазмід в клітинах-трансформантах (**рис. 2**). Слід також зазначити, що час розділення плазмід в цьому разі був дещо більший – 3 години. Тому не візуалізуються ледь помітні мінорні треки плазмиди mCherry, які були помітні на **рис. 1** (доріжки 4 та 5).

У статті Green, M. R., та Sambrook, J. зазначено, що у стандартних лабораторних умовах типовою ефективністю трансформації є значення від 1×10^8 до 3×10^8 КУО/мкг для *E. coli* [19]. За дослідженнями науковців Yang, Y., Liu, M., Wang, T. та інші отримано результати частоти трансформації з використанням методу компетентності TSS-HI, який оптимізований за допомогою методів Ханахана та Іноу. Штам *E. coli* BW25113 та його похідні штами набули компетентності і були трансформовані плазмідами що несуть гени стійкості до ампіциліну, спектиноміцину, хлорамфеніколу та апраміцину. Ефективність трансформації за даними методами становить приблизно 7×10^9 КУО/мкг [21].

Автори Torres-Cortés G., Garcia B.J., Compant S. та інші використали метод Іноу для штаму *E. coli* MFDpir, щоб трансформувати бактерії плазмідами pEX18Tc-Δhcr та pEX18Tc-ΔtssB. Плазмиди переносили в бактерію *Stenotrophomonas rhizophila* CFBP13503 шляхом кон'югації з метою вивчення білків Hcr та TssB, які важливі для інгібування росту фітопатогенної бактерії Xcc8004. Для визначення трансформантів, бактерії висівали на середовища з тетрацикліном [22].

У контексті результатів про трансформацію суперкомпетентних клітин штаму *Escherichia coli* XL1-Blue плазмідною pSBbi-RN (RN) з використанням методу Іноу, доцільно згадати наступне. За даними Heydenreich, F.M., Miljuš, T., Jaussi, R. та інші ефективність генетичної рекомбінації суперкомпетентних клітин штаму *E. coli* XL1-Blue, отриманих методом Іноу, при трансформації плазмідною pBR322, яка

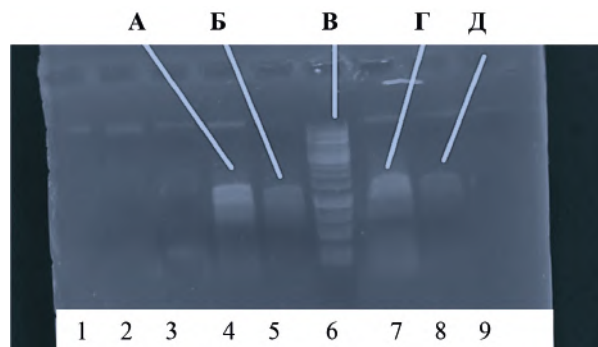


Рисунок 1 – Електрофореграма продуктів плазмідних ДНК, виділених із клонів-трансформантів, отриманих методом Ханахана: А – *E. coli* XL1-Blue(mCherry), Б – *E. coli* 906(mCherry), В – маркер молекулярних мас, Г – *E. coli* XL1-Blue(RN), Д – *E. coli* 906(RN). Доріжки 1-3 та 9 – контрольні, некомпетентні безплазмідні штами (*E. coli* C600, *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* 906 відповідно), 4, 5 та 7, 8 – клони-трансформанти.

Таблиця 2 – Частота трансформації суперкомпетентних клітин штамів *E. coli* XL1-Blue та 906 за методом Іноу

Штам <i>E. coli</i> / плазмід	Частота трансформації, КУО/1 мкг ДНК
XL1-Blue / mCherry	2×10^5
XL1-Blue / RN	1×10^5
906 / mCherry	15×10^5
906 / RN	1×10^5

містить гени антибіотикостійкості до ампіциліну та тетрацикліну, складає щонайменше 1×10^7 КУО/мкг. рВR322 має більшу ефективність трансформації ніж RN. Альтернативою використання рВR322 є застосування плазмід рUC19, які є модифікованими векторами рВR322. Плазмід рSBbi-RN (RN), що використовується в досліді, має векторний хребет рUC19. Обидві плазмід несуть гени стійкості до аміциліну (Amp^R), але рВR322 додатково містить ген стійкості до тетрацикліну (tet^R). Основна відмінність між рВR322 і рSBbi-RN полягає в їх розмірі: рВR322 є плазмідним вектором довжиною 4361 п.н., тоді як рUC19 є плазмідним вектором довжиною 2021 п.н. [23].

За дослідженням авторів Thomas Fryer, Darian S. Wolff, View Max D. Overath та інших було визначено ефективність хімічної трансформації та електропорації *E. coli* XL1-Blue плазмідною PF-Nbb102-CAM, що представлена як кільцева суперскручена плазмід, релаксована кільцева плазмід, зібрана методом Golden Gate та лінійна ДНК, яка була отримана в результаті нікасної обробки RCA. Плазмід PF-Nbb102-CAM має гени стійкості до хлорамфеніколу і кодує VHH. Вони виявили, що хімічно компетентні клітини були ефективніше трансформовані за допомогою лінійної ДНК, а електрокомпетентні клітини релаксують кільцевою ДНК. У результаті цього спостереження дослідники вивчили різні параметри, пов'язані з хімічною трансформацією. Крім того, вони досліджували потенційну масштабованість хімічної трансформації, що виконується паралельно для кількох зразків, та використання збільшених об'ємів клітин. Авторами було встановлено, що найефективніший підхід передбачав використання модифікованого протоколу Іноу [24].

У дослідженні авторів Khasanah A.U., Putri W.A., Rahayu H.M. та інші клітини *E. coli* BL21 були трансформовані антибіотикорезистентною плазмідною рЕТ-28с, яка містить ген *merA* зі *Strep-*

tomyces AS2. Компетентні клітини *E. coli* BL21 були отримані за допомогою методу Іноу. Плазмід рЕТ-28с використовується для експресії білків у бактеріях, зокрема у *E. coli*. Крім того, рЕТ-28с містить ген резистентності до антибіотика канаміцину, а ген *merA* кодує білок, який допомагає знижувати токсичність ртуті. Після трансформації тепловим шоком клітини були вибрані за допомогою антибіотика канаміцину, який був присутній у середовищі для відбору клітин, що успішно прийняли плазмід. Згідно з наданими даними, після трансформації гену *merA* у клітини *E. coli* BL21 було отримано позитивний результат. Це було підтверджено здатністю ізолятив рости на селективному середовищі LB з канаміцином (20 мкг/мл) та утворенням приблизно 40 колоній після інкубації протягом 24 годин при 37°C. Цей позитивний результат свідчить про здатність плазмід продукувати цільові білки [25].

У роботі Vamsi Bharadwaj, S. V., Tiwari, D. S., Ghosh, T. та інші було введено плазмід рSYN_1-DTT1-RFP та плазмід рSYN_1-DTT2-RFP в *E. coli* DH5α, яку зробили компетентною методом Іноу. Ці плазмід мають гени стійкості до антибіотика стрептоміцину, тому трансформантів відбирали висівом у середовище з антибіотиком. Отримані трансформанти вирощували на селективному середовищі при різних температурах для оцінки впливу температурного фактора на експресію RFP (червоний флуоресцентний білок) у рекомбінантів [26].

Також метод Іноу був використаний у багатьох дослідженнях на клітинах *E. coli* DH5α для отримання білку та клонування плазмід. У роботі авторів Bhat, S., Banerjee, A., та Alagesan, S. *E. coli* DH5α була використана для клонування та поширення плазмід, таких як pTargetF_g1_HA і pTargetF_g2_HA. Трансформовані плазмідними pTargetF_g1_HA і pTargetF_g2_HA клітини *E. coli* DH5α відбирали на селективному середовищі з антибіотиком спектиноміцином, оскільки дані плазмід були створені на основі плазмід pTargetF, яка має детермінанту стійкості до спектиноміцину. Надалі плазмід використовували для видалення гену *araC* у бактерії *E. coli* MG1655 для подальших генно-інженерних розробок [27].

За результатами досліджень науковців Lemay-St-Denis, C., Diwan, S. S. та Pelletier, J. N по трансформації плазмідними dfrB10-pET24 та dfrB11-pET24 компетентних клітин штаму *E. coli* DH5α були отримані рекомбінанти, які відбирали за маркером стійкості до канаміцину. Надалі трансформанти використовували як продуцентів білків в результаті експресії генів DfrB10 та DfrB11 [28].

Висновки.

Досліджено частоту трансформації клітин *E. coli*, приведених до стану компетентності та некомпетентних клітин. Визначено частоту трансформації компетентних клітин *E. coli* XL1-Blue плазмідними mCherry з детермінантою стійкості до канаміцину та RN з детермінантою стійкості до ампіциліну, що дорівнювала 3×10^2 КУО/мкг ДНК та $2,5 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК відповідно. При трансформації компетентних клітин *E. coli* 906 тими ж плазмідними частота отримання рекомбінантів складала $2,8 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК та 2×10^2 КУО/мкг ДНК відповідно. Ефективність трансформації плазмідними

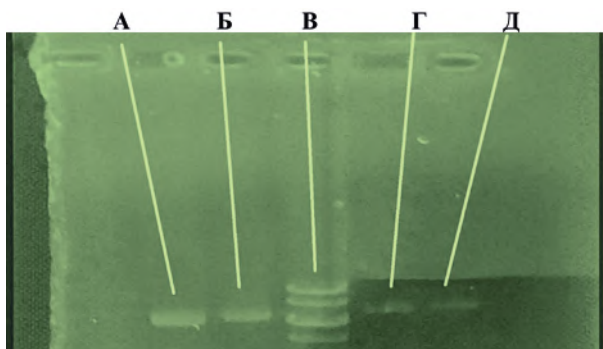


Рисунок 2 – Електрофореграма продуктів плазмідних ДНК, виділених із клонів-трансформантів, отриманих методом Іноу: А – *E. coli* XL1-Blue(mCherry), Б – *E. coli* 906(mCherry), В – маркер молекулярних мас, Г – *E. coli* XL1-Blue(RN), Д – *E. coli* 906(RN).

некомпетентних клітин досліджуваних штамів *E. coli* дорівнювала 0.

Встановлено високу частоту трансформації R-плазмідами суперкомпетентних клітин *E. coli* штамів XL1-Blue та 906, одержаних за методом Іноу, яка дорівнювала $(1-2) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК та $(1-15) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК відповідно. Отримані дані наявності нуклеїнових кислот плазмідного походження на агарозному гелі після проведення електрофорезу підтверджують факт трансформації суперкомпетентних клітин штамів *E. coli* XL1-Blue та 906 плазмідами mCherry i RN.

Перспективи подальших досліджень.

Результати досліджень можуть бути застосовані для моніторингу та якісного аналізу результатів трансформації бактерій плазмідами, що несуть гени резистентності до антибіотиків. Це може відкрити нові можливості для розробки стратегій контролю над антибіотикорезистентними бактеріями та збереження ефективності антибіотиків. Дослідження може бути корисним для подальшого розвитку молекулярної біології, біотехнологій та генетичної інженерії.

References / Література

- San Millan A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. Trends Microbiol. 2018 Dec;26(12):978-85.
- Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. Nat Rev Microbiol. 2012 Jun 11;10(7): 472-82.
- Palmen R, Vosman B, Kok R, van der Zee JR, Hellingwerf KJ. Characterization of transformation-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus*. Mol Microbiol. 1992 Jul;6(13):1747-54.
- Page WJ, Sadow H. Physiological factors affecting transformation of *Azotobacter vinelandii*. J Bacteriol. 1976 Mar;125(3):1080-7.
- Smith HO, Danner DB, Deich RA. Genetic transformation. Annu Rev Biochem. 1981;50:41-68.
- Tsen SD, Fang SS, Chen MJ, Chien JY, Lee CC, Tsen DH. Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*. J Biomed Sci. 2002;9(3):246-52.
- Azai C, Harada J, Hirozo OO. Gene expression system in green sulfur bacteria by conjugative plasmid transfer. PLoS One. 2013 Nov 27;8(11):e82345. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842273/>.
- Carlson CA, Pierson LS, Rosen JJ, Ingraham JL. *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. J Bacteriol. 1983 Jan;153(1):93-9.
- Lorenz MG, Wackernagel W. Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. Arch Microbiol. 1990;154(4):380-5.
- Lorenz MG, Sikorski J. The potential for intraspecific horizontal gene exchange by natural genetic transformation: sexual isolation among genomovars of *Pseudomonas stutzeri*. Microbiology (Reading). 2000 Dec;146(12):3081-90.
- Frischer ME, Thurmond JM, Paul JH. Natural plasmid transformation in a high-frequency-of-transformation marine *Vibrio* strain. Appl Environ Microbiol. 1990 Nov;56(11):3439-44.
- Hoedt EC, Bongers RS, Bottacini F, Knol J, MacSharry J, van Sinderen D. Bifidobacterium Transformation. Methods Mol Biol. 2021;2278:13-19.
- Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 1990 Nov;4(11):1911-9.
- Ithurbide S, Coste G, Lisboa J, Eugénie N, Benthikou E, Bouthier de la Tour C et al. Transformation in *Deinococcus radiodurans*: A Genetic Analysis Reveals the Major Roles of DprA, DdrB, RecA, RecF, and RecO Proteins. Front Microbiol. 2020 Jun 18;11:1253.
- Parker C, Meyer RJ. Selection of plasmid molecules for conjugative transfer and replacement strand synthesis in the donor. Mol Microbiol. 2002 Nov;46(3): 761-8.
- Spaniol V, Bernhard S, Aebi C. *Moraxella catarrhalis* AcrAB-OprM efflux pump contributes to antimicrobial resistance and is enhanced during cold shock response. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):1886-94.
- Dawan J, Ahn J. Bacterial Stress Responses as Potential Targets in Overcoming Antibiotic Resistance. Microorganisms. 2022 Jul 9;10(7):1385.
- Albritton WL, Setlow JK, Thomas M, Sottnek F, Steigerwalt AG. Heterospecific transformation in the genus *Haemophilus*. Mol Gen Genet. 1984;193(2):358-63.
- Green MR, Sambrook J. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: «Ultrasensitive» Cells. Cold Spring Harb Protoc. 2020 Jun 1;2020(6):101196.
- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol. 1981 Mar;145(3):1365-73.
- Yang Y, Liu M, Wang T, Wang Q, Liu H, Xun L, et al. An Optimized Transformation Protocol for *Escherichia coli* BW3KD with Supreme DNA Assembly Efficiency. Microbiol Spectr. 2022 Dec 21;10(6):e0249722 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9769673/>.
- Torres-Cortés G, Garcia BJ, Compant S, Rezki S, Jones P, Préveaux A, et al. Differences in resource use lead to coexistence of seed-transmitted microbial populations. Sci Rep. 2019 Apr 30;9(1):6648.
- Heydenreich FM, Miljús T, Milić D, Veprintsev DB. High-throughput Site-directed Scanning Mutagenesis Using a Two-fragment PCR Approach. Bio Protoc. 2020 Jan 5;10(1):e3484. Available from: .
- Fryer T, Wolff DS, Overath MD, Schäfer E, Laustsen AH, Jenkins TJ, et al. Simplified post-assembly plasmid library amplification for increased transformation yields in *E. coli* and *S. cerevisiae*. bioRxiv. 2023. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.11.02.565362v1.full.pdf>.
- Khasanah AU, Putri WA, Rahayu HM, Sembiring L, Purwestri YA. Expression and Structural Characterization of Recombinant Mercuric Reductase Protein Isolated from *Streptomyces*. Research Square. 2022. Available from: https://www.researchsquare.net/publication/358837003_Expression_and_Structural_Characterization_of_Recombinant_Mercuric_Reductase_Protein_Isolated_from_Streptomyces.
- Vamsi Bharadwaj SV, Tiwari DS, Ghosh T, Mishra S. Construction of pSM201v: A broad host range replicative vector based on shortening of RSF1010. Heliyon. 2023 Mar 18;9(4):e14637. Available from: .
- Bhat S, Banerjee A, Alagesan S. AraC-Based Biosensor for the Detection of Isoprene in *E. coli*. ACS Omega. 2023 Jul 18;8(30):26806-15.
- Lemay-St-Denis C, Diwan SS, Pelletier JN. The Bacterial Genomic Context of Highly Trimethoprim-Resistant DfrB Dihydrofolate Reductases Highlights an Emerging Threat to Public Health. Antibiotics (Basel). 2021 Apr 13;10(4):433. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8103504/>.

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ R-ПЛАЗМІДАМИ КЛІТИН РІЗНОГО СТУПЕНЮ КОМПЕТЕНТНОСТІ *ESCHERICHIA COLI*

Скляр Т. В., Богатова О. Д., Гаврилюк В. Г., Лаврентьєва К. В., Курагіна Н. В.

Резюме. У даній роботі досліджено перенос R-плазмід в ході трансформації у бактерій. Здатність до переносу детермінант резистентності є важливим фактором для набуття селективних переваг окремими клітинами в популяції мікроорганізмів. Проблема збільшення кількості та інтенсивності циркуляції антибіотико-

резистентних мікроорганізмів обумовлена плазмідами, які передаються з високою частотою в популяціях мікроорганізмів в результаті генетичної трансформації.

Метою роботи було проведення порівняльного аналізу частоти трансформації клітин *Escherichia coli* різного ступеню компетентності плазмідами з детермінантами стійкості до антибіотиків.

Методи досліджень: мікробіологічні, генетичні, біометричні.

Результати. Здатність до трансформації визначається ступенем компетентності мікробних клітин. Існує багато видів бактерій, у яких відсутня природна компетентність або її прояв знаходиться на низькому рівні, але вони також можуть бути трансформовані під дією певних фізичних та хімічних індукторів. Тому було запропоновано провести порівняльний аналіз частоти трансформації клітин *Escherichia coli* штамів XL1-Blue та 906 різного ступеню компетентності плазмідами з детермінантами стійкості до антибіотиків: pSBbi-RN (RN) з геном стійкості до ампіциліну та mCherry-Mito-7 (mCherry) з геном стійкості до канаміцину. Була проведена оцінка частоти трансформації клітин *E. coli* штамів XL1-Blue та 906 плазмідами MCerry та RN. Виявлено, що для компетентних клітин *E. coli* XL1-Blue частота трансформації складала відповідно 3×10^2 КУО/мкг ДНК та $2,5 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК, а для штаму *E. coli* 906 — $2,8 \times 10^2$ КУО/мкг ДНК та 2×10^2 КУО/мкг ДНК. Ефективність трансформації плазмідами некомпетентних клітин досліджуваних штамів *E. coli* дорівнювала 0. Суперкомпетентні клітини отримані методом Іноу виявили високу ефективність трансформації, яка складала $(1-2) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК для *E. coli* XL1-Blue та $(1-15) \times 10^5$ КУО/мкг ДНК для *E. coli* 906. Отримані дані з електрофорезу в агарозному гелі свідчать про успішний перенос плазмід під час трансформації.

Ключові слова: генетична трансформація, плазміди антибіотикорезистентності, компетентні клітини, суперкомпетентні клітини.

GENETIC TRANSFORMATION OF ESCHERICHIA COLI CELLS WITH DIFFERENT DEGREES OF COMPETENCE WITH R-PLASMIDS

Sklyar T. V., Bohatova O. D., Gavryliuk V. G., Lavrentieva K. V., Kurahina N. V.

Abstract. In this research the transfer of R-plasmids during transformation in bacteria was investigated. The ability to transfer resistance determinants is an important factor for the acquisition of selective advantages by individual cells in a population of microorganisms. The problem of increasing the number and intensity of circulation of antibiotic-resistant microorganisms is caused by the possibility of transferring plasmids, which are transmitted with a high frequency in populations of microorganisms as a result of transformation.

Aim of the study. Carrying out a comparative analysis of the frequency of transformation of *Escherichia coli* cells of different degrees of competence by plasmids with antibiotic resistance determinants.

Research methods: microbiological, genetic, biometric.

Results. The ability to transform is determined by the degree of competence of microbial cells. There are many species of bacteria that lack natural competence or show it at a low level, but they can also be transformed under the action of certain physical and chemical inducers. Therefore, it was proposed to conduct a comparative analysis of the frequency of transformation of *Escherichia coli* cells of strains XL1-Blue and 906 of different degrees of competence with plasmids with determinants of resistance to antibiotics: pSBbi-RN (RN) with the gene for resistance to ampicillin and mCherry-Mito-7 (mCherry) to kanamycin. The frequency of transformation of *E. coli* cells of strains XL1-Blue and 906 with MCerry and RN plasmids was evaluated. It was found that for *E. coli* XL1-Blue, the transformation frequency was 3×10^2 CFU/mkg DNA and 2.5×10^2 CFU/mkg DNA, respectively, and for *E. coli* strain 906 — 2.8×10^2 CFU/mkg DNA and 2×10^2 CFU/mkg DNA. The efficiency of R-plasmid transformation of incompetent cells of the studied strains of *E. coli* was equal to 0. Supercompetent cells obtained by the Inoue's method showed high transformation efficiency, which was $(1-2) \times 10^5$ CFU/ mkg DNA for *E. coli* XL1-Blue and $(1-0.15) \times 10^5$ CFU/ mkg DNA for *E. coli* 906. The obtained data from electrophoresis on agarose gel indicate successful transfer of R-plasmids during transformation into bacterial cells.

Key words: genetic transformation, antibiotic resistance plasmids, competent cells, supercompetent cells.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Sklyar T. V.: <https://orcid.org/0000-0003-0224-2460>^{AF}

Bohatova O. D.: <https://orcid.org/0009-0005-3965-4997>^{BD}

Gavryliuk V. G.: <https://orcid.org/0000-0003-0112-3275>^{BD}

Lavrentieva K. V.: <https://orcid.org/0000-0002-2711-7968>^C

Kurahina N. V.: <https://orcid.org/0000-0001-7184-2836>^E

Conflict of interest: / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Kurahina Nina Volodymyrivna / Курагіна Ніна Володимирівна

Oles Honchar Dnipro National University / Дніпропетровський національний університет ім. Олеса Гончара

Ukraine, 49000, Dnipro, 9 Naukova str. / Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Наукова 9

Tel.: +380973638841 / Тел.: +380973638841

E-mail: microviro@ukr.net

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 24.09.2023 / Стаття надійшла 24.09.2023 року
Accepted 29.02.2024 / Стаття прийнята до друку 29.02.2024 року