

О. Н. РУДЧЕНКО, Н. А. ЛИХАЧЕВА, Н. В. ТИМАКОВА, Б. Н. ИЛЬЯШЕНКО  
**ФАКТОР КОМПЕТЕНТНОСТИ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ  
ESCHERICHIA COLI**

(Представлено академиком В. Д. Тимаковым 14 XII 1972)

При изучении трансфекции клеток *Escherichia coli* изолированной ДНК фага  $\lambda$  в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  нами было обнаружено, что уровень трансфекции в значительной мере определяется физиологическим состоянием культуры <sup>(1)</sup>. Высокая восприимчивость к ДНК фага  $\lambda$  наблюдалась лишь у клеток в поздней логарифмической фазе роста или при переходе их в стационарную фазу и сохранялась в течение 30–60 мин. Динамика изменения чувствительности культуры *E. coli* к ДНК фага  $\lambda$  весьма напоминала поведение клеток трансформабильных видов бактерий. Это обстоятельство заставило нас искать более глубоких аналогий между физиологическим состоянием восприимчивых к ДНК клеток *E. coli* и клеток трансформабильных видов. Как известно, способность клеток воспринимать трансформирующую ДНК определяется переходом их в так называемое состояние компетентности. Как показано, для многих трансформабильных бактерий при этом в среду выделяется клетками какое-то вещество, которое называют фактором компетентности. У *E. coli*, которую до недавнего времени нельзя было отнести к трансформабильным бактериям, такой фактор не описан. Мы попытались обнаружить фактор компетентности в культуральной жидкости *E. coli*.

Природа, свойства и, вероятно, механизм действия фактора компетентности отличны у разных видов бактерий. Общим является одно свойство — при добавлении к некомпетентным клеткам лизогенного или близкородственного штамма бактерий указанный фактор может индуцировать компетентность, и такие клетки становятся высоковосприимчивыми к изолированному ДНК. Поэтому эксперименты по обнаружению фактора компетентности целесообразно было начать с испытания культуральной жидкости бактерий, находящихся на разных стадиях роста, на ее способность восстанавливать компетентность у ранее некомпетентных клеток.

Работа выполнена на штаммах *E. coli* HfrH и X7026. Трансфекцию осуществляли изолированной ДНК фага  $\lambda\text{C}_{1857}$ . Лизаты фага  $\lambda\text{C}_{1857}$  получали методом термоиндукции штамма *E. coli* CR34 ( $\lambda\text{C}_{1857}$ ) с последующей вирулентной репликацией на штамме *E. coli* X7026. Лизаты концентрировали с помощью полиэтиленгликоля с молекулярным весом 6000, очищали на центрифуге Spinco модель L. Метод концентрации и очистки фага и способ выделения ДНК описан ранее <sup>(1)</sup>.

Трансфекцию клеток ДНК осуществляли в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  по методике, описанной Mandel и Higa <sup>(2)</sup> и несколько модифицированной в нашей лаборатории <sup>(1)</sup>.

Испытание культуральной жидкости на наличие фактора компетентности проводили по следующей схеме. Клетки реципиента выращивали при встряхивании в среде, содержащей 2% казеиновых кислот <sup>(1)</sup>. Через различные промежутки времени выращивания культуры отбирали пробы. Клетки осаждали и оценивали их способность к трансфекции ДНК фага  $\lambda$ , а культуральную жидкость собирали. Параллельно выращивали культуру некомпетентного реципиента. В качестве такового использовали клетки

Таблица 1

Влияние культуральной жидкости *E. coli* X7026 и *E. coli* HfrH на уровень трансфекции клеток *E. coli* ДНК фага  $\lambda$

| Время выращивания бактерий, час. | Число инфекционных центров в 1 мл |                | Время отбора культуральной жидкости, час. | Число инфекционных центров в 1 мл                         |                                                          |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                                  | клетки X7026                      | клетки HfrH    |                                           | клетки, обработанные культуральной жидкостью штамма X7026 | клетки, обработанные культуральной жидкостью штамма HfrH |
| 1                                | $2 \cdot 10^2$                    | $< 2 \cdot 10$ | 1                                         | $< 2 \cdot 10$                                            | 8 $\cdot 10$                                             |
| 2                                | $1,2 \cdot 10^4$                  | $2 \cdot 10$   | 2                                         | $5 \cdot 10^3$                                            | 8 $\cdot 10$                                             |
| 3                                | $1,4 \cdot 10^4$                  | $2 \cdot 10$   | 3                                         | $1 \cdot 10^4$                                            | $2,6 \cdot 10^3$                                         |
| 3,5                              | $1,1 \cdot 10^4$                  | $< 2 \cdot 10$ | 3,5                                       | $1 \cdot 10^4$                                            | 4 $\cdot 10$                                             |
| 5                                | $2 \cdot 10^3$                    | $< 2 \cdot 10$ | 5                                         | $< 2 \cdot 10$                                            | $1,4 \cdot 10^3$                                         |

*E. coli* HfrH, на которых регулярно получали низкий уровень трансфекции независимо от стадии роста культуры. Обычно клетки *E. coli* HfrH выращивали при встряхивании в течение 3 час. при 37°, после чего клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в  $\frac{1}{10}$  объема 0,2 М CaCl<sub>2</sub>, разливали по 0,2 мл в пробирки и добавляли 5 мл испытуемой культуральной жидкости. В контрольную пробирку добавляли свежую среду. Клетки инкубировали с культуральной жидкостью в течение 15 мин. при 37°, затем центрифугировали, переводили вновь в 0,2 М CaCl<sub>2</sub>, охлаждали и осуществляли трансфекцию ДНК фага  $\lambda$ , как было описано ранее (1).

Данные типичного эксперимента представлены в табл. 1. Подобных экспериментов было поставлено 15 и во всех были получены аналогичные результаты. Было обнаружено, что культуральная жидкость от клеток *E. coli* X7026 увеличивает способность к трансфекции *E. coli* HfrH в несколько сот раз. Эффект был тем больше, чем выше уровень компетентности клеток, от которых получали культуральную жидкость. Так, культуральная жидкость от «молодых» культур (до 2 час. роста) и от «старых» клеток (после 4 час.) почти не увеличивала трансфекцию клеток *E. coli* HfrH. Наибольший эффект наблюдали в случае культуральной жидкости от клеток, находящихся в пике компетентности. Трансфекция не увеличивалась или увеличивалась очень незначительно после инкубации клеток с культуральной жидкостью от *E. coli* HfrH, взятой в любой фазе роста.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в культуральной жидкости *E. coli* X7026 по мере роста накапливается какое-то вещество, которое по способности индуцировать восприимчивость к ДНК у некомпетентных клеток схоже с фактором компетентности у трансформационных бактерий. Отсутствие активности в культуральной жидкости от клеток, переросших стадию компетентности, может быть обусловлено или нестабильностью фактора компетентности и его разрушения в «старых» культурах, или накоплением в культуральной жидкости «старых» культур ингибитора, мешающего проявлению фактора компетентности.

Предварительные данные, полученные при изучении свойств фактора компетентности у *E. coli* X7026 свидетельствуют о том, что это вещество, которое не переходит через диализный мешок при диализе, сохраняет свою активность при хранении при 4°. Взаимодействие фактора компетентности с клетками — процесс, зависящий от температуры, с оптимумом в пределах 37°, что может свидетельствовать о его ферментативной природе.

Институт эпидемиологии и  
микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи  
Академии медицинских наук СССР  
Москва

Поступило  
21 XI 1972

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> О. Н. Рудченко, Н. А. Лихачева и др., Вопросы вирусологии, 1973.
- <sup>2</sup> M. Mandel, A. Higa, J. Molecul. Biol., 53, 159 (1970).