

## Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК

Г. Ю. Мирюта, А. С. Дворник, Л. П. Можилевська, Т. П. Перерва

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*У системі трансформації хлор-кальцієвих компетентних клітин E. coli плазмідною pBR322 показано регенеруючі властивості екстрактів біомаси культивованих клітин деяких лікарських рослин. Ці властивості проявлялися у зменшенні виходу трансформантів та відновленні життєздатності клітин, підданих жорсткій обробці.*

Вступ. Широке використання препаратів рослинного походження у медицині, косметичній та харчовій промисловості породжує значний інтерес до розуміння діапазону їхніх властивостей, доз вживання та механізмів дії. Серед лікувальних ефектів рослинних екстрактів найважливішими вважаються імуностимулюючі, адаптогенні, радіопротекторні та протипухлинні, широко відомі також їхні бактерицидні, противірусні та регенеруючі можливості. Останнім часом вельми перспективними виглядають антимутагенні та антиоксидантні властивості екстрактів багатьох лікарських рослин [1].

Для вивчення згаданих властивостей важливою є наявність адекватних тест-систем та сприйнятливих тест-об'єктів, які дозволяли б відслідковувати активність препаратів на різних рівнях — на рівні цілісного організму (імуностимулююча, адаптогенна), ізольованих органів (органоспецифічність), тканин (наприклад, протипухлинні властивості), окремих клітин (бактерицидні та противірусні), органел (вивчення мембранотропності на штучних мембранах) та макромолекул (зокрема, антиоксидантні властивості).

Хоча біологічна дія рослинних препаратів виявляється здебільшого на різних ступенях організації живих систем, активність багатьох з них визначається, перш за все, здатністю впливати на зовнішні мембрани клітин-мішеней. Цей вплив мо-

же виявлятися як у взаємодії з відповідними рецепторами, так і в зміні структурно-функціональної організації та фізико-хімічного стану мембрани. Такі явища спричинюють, в цілому, зміну активності ферментних систем (наприклад циклазних) та проникність клітинної мембрани для природних субстратів і метаболітів, що в свою чергу, викликає низку біологічних ефектів [2].

У даній роботі зроблено спробу відслідкувати на рівні мембран регенеруючі (відновлюючі) властивості рослинних екстрактів у рамках системи трансформації хлор-кальцієвих компетентних клітин *E. coli* плазмідною ДНК. Відомо, що процес індукованої, зокрема холодним кальцієм, компетентності супроводжується значними ушкодженнями поверхневих структур клітин і в більшості закінчується їхньою загибеллю [3]. Нами наведено дані стосовно здатності рослинних екстрактів знижувати рівень трансформації екзогенною ДНК та відновлювати загальне виживання таких клітин.

**Матеріали і методи. Бактерії.** В роботі використано штам *E. coli* HB101 та плазмиду *pBR322*, отримані з Інституту біохімії та фізіології мікроорганізмів РАН (Пушціно, РФ).

**Живильні середовища та реактиви.** Бактеріальну культуру вирощували на повноцінному середовищі Лурія—Бертані (LB-середовище) [4]. Концентрації антибіотиків ампіциліну і тетрацикліну у середовищі становили 50 і 12,5 мкг/мл відповідно. Використовували також агаризоване (1,7 %) живильне LB-середовище.

**Умови вирощування бактеріальної культури.** Бактерії вирощували на агаризованому LB-середовищі при температурі 37 °С. Нічні культури застосовували для інокуляції рідкого LB-середовища з наступним культивуванням на качалці (37 °С до досягнення культурою середини логарифмічної фази росту при оптичній густині ( $ОГ_{550}$ ), рівній 0,3. Оптичну густину бактеріальної суспензії визначали за допомогою фотометра КФК-3.

**Компетентні клітини** отримували кальцієвим методом у буфері, який містив 10 мМ трис-НСІ, рН 8,0, 50 мМ СаСІ<sub>2</sub>; трансформацію компетентних клітин плазмідом проводили згідно з [5].

Плазмідну ДНК виділяли методом лужного екстрагування. Далі здійснювали її рестрикцію та електрофорез за стандартними методиками, використовуючи трис-боратний буфер.

**Рослинні екстракти.** Досліджували активність 40 %-х етанольних екстрактів, одержаних з біомаси культивованих клітин стандартним методом перколяції сухої біомаси. Кінцеве співвідношення спирт:біомаса становило 10:1. Джерелом біомаси слугували: біомаса культури тканин унгерії Віктора *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko з родини *Amaryllidaceae* (штам UV-2, колекційний № 10, ККК ІМБіГ НАН України, Київ) — далі екстракт *U. victoris*; женьшеню справжнього *Panax ginseng* С. А. Меу. з родини *Araliaceae* (штам *Panax* БІО-2МК, колекційний № 11, ККК ІМБіГ НАН України) — далі екстракт *P. ginseng*; родіоли рожевої *Rhodiola rosea* L. з родини *Crassulaceae* (штам ЗК-1, колекційний № 29, ВСКК-ВР, Москва, РФ) — далі екстракт *Rh. rosea*; полісціаса папоротелистого *Polyscias filicifolia* Bailey з родини *Araliaceae* (штам *Polyscias* F-2, колекційний № 6, ККК ІМБіГ НАН України) — далі екстракт *P. filicifolia*. Використані штами клітинних культур лікарських рослин одержано у відділі генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України.

Методом перколяції готували також 40 %-й етанольний екстракт натурального кореня родіоли рожевої (місце походження — Алтай) — далі екстракт *Rh. rosea* нат.

Екстракти випаровували за допомогою вакуумно-ротаційного випаровувача за температури 40 °С майже до сухого залишку і розчиняли у стерильній дистильованій воді до вихідного об'єму екстракту.

Активність екстрактів виявляли за зміною кінцевого виходу трансформантів та загального виживання клітин у варіанті з екстрактом порівняно з контролем. Екстракти вносили в інкубаційну суміш до кінцевої концентрації 5 % (за об'ємом). Вихід трансформантів визначали висіванням проб на агаризоване LB-середовище з антибіотиками, загальне

виживання бактеріальних клітин — висіванням проб на агаризоване LB-середовище без антибіотиків. Статистичну обробку даних проводили за *t*-критерієм Ст'юдента [6].

**Результати і обговорення.** Вплив рослинних екстрактів на рівень трансформації вивчали на двох стадіях інкубування клітин з ДНК — до термошоку та після нього. Екстракти вносили в інкубаційну суміш за 30 хв до шоку (одночасно з плазмідною ДНК) або відразу після нього. Отримані результати, наведені на рис. 1, свідчать про те, що всі досліджені екстракти здатні ефективно знижувати кінцевий вихід трансформантів при обох варіантах введення екстрактів. Варто відзначити, що перша стадія виявилася значно чутливішою до присутності екстрактів, ніж друга. Так, внесення екстрактів за 30 хв до термообробки викликало понад 90 %-ве зниження виходу трансформантів у випадку екстрактів *U. victoris*, *P. ginseng*, *Rh. rosea* та *Rh. rosea* нат. і 30 %-ве зниження у випадку екстракту *P. filicifolia* порівняно з контролем (варіант без екстракту). Разом з тим присутність екстрактів на стадії інкубування клітин, які вже пройшли термошок, спричинювала зменшення кількості трансформантів лише на 20 % (*U. victoris*), 30 % (*P. filicifolia*, *Rh. rosea* нат.) та 40—45 % (*P. ginseng*, *Rh. rosea*) порівняно з контролем.

З літературних даних відомо, що під час передшокового інкубування клітин при температурі 0 °С у присутності катіонів відбуваються виражена агрегація клітин, викликана нейтралізацією їхнього негативного поверхневого заряду катіонами, та адсорбція ДНК на клітинах [7]. Агрегація клітин має важливе значення в індукції трансмембранного переносу ДНК, оскільки при наступному термошоку розвиваються багаточисельні міжклітинні та міжмембранні контакти (переважно між фосфоліпідними ділянками мембран). У місці таких контактів відбувається злипання мембран та формування своєрідних щілиновидних пор [7]. Ці пори ( $d \approx 45$  нм) здатні пропустити ДНК, попередньо адсорбовану на ділянках клітинної поверхні, збагачених фосфоліпідами, яким поряд з дивалентними катіонами належить важлива роль у температурозалежній появі неспецифічної проникності клітинної оболонки та переносі ДНК [8—10].

Аналізуючи отримані результати, слід враховувати, що певні сполуки рослинних екстрактів виявляють здатність змінювати проникність мембран у той чи інший бік. Зокрема, таку активність показано для таніну, індольних алкалоїдів резерпіну та стрихніну [11], кумаринів [12]; для багатьох сполук рослинного походження виявлено здат-

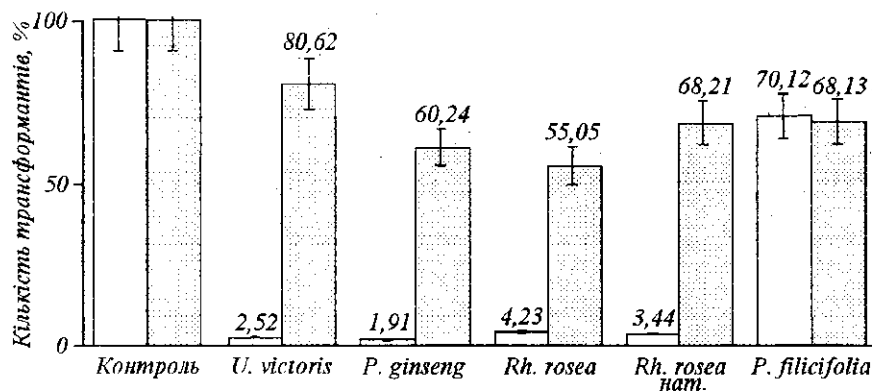


Рис. 1. Вплив рослинних екстрактів на вихід трансформантів. Екстракти вносили: за 30 хв до термошоку (білі стовпчики) або зразу після нього (сірі стовпчики)

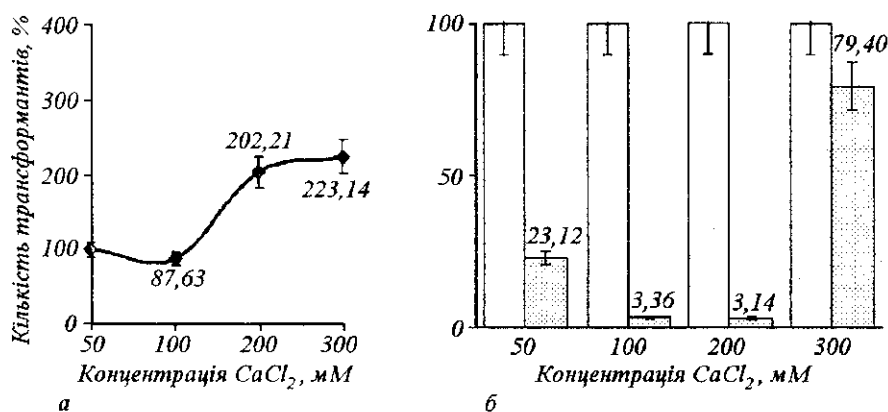


Рис. 2. Вихід трансформантів залежно від концентрації CaCl<sub>2</sub> (а) та при різних концентраціях CaCl<sub>2</sub>, прийнятих за відповідні контролю (білі стовпчики), у присутності екстракту *U. victoris* (сірі стовпчики)

ність стабілізувати мембрани за рахунок послаблення перекисного окислення ліпідів мембран [13, 14].

Не виключено, що в нашому випадку зв'язування рослинних сполук з мембранними фосfolіпідами ускладнює процес міжклітинних контактів у ділянках злипання мембран, що веде в кінцевому результаті до зменшення кількості пор та ефективності переносу ДНК. Подібний пригнічуючий ефект на трансформацію виявляє обробка клітин (0 °С) фосfolіпазою, що пояснюють специфічним зв'язуванням ферменту з ділянками клітинної поверхні, збагаченими фосfolіпідами [15].

Отримані нами результати щодо різної чутливості до- та післяшокової стадій трансформації до дії рослинних екстрактів узгоджуються з літературними даними. Так, відомо, що саме в процесі теплового шоку відбувається катіон-індуковане перенесення ДНК в цитоплазму [7]. Очевидно, що вплив екстрактів на «готові» трансформанти, які виникли під час термошоку, буде менш значним, ніж на процеси адсорбції ДНК та агрегації клітин,

що мають місце на першій стадії та визначають ефективність трансформації.

Вплив екстрактів на вихід трансформантів явно залежить від молярності розчину CaCl<sub>2</sub>, використаного для приготування компетентних клітин. У наступному досліді досліджували екстракт *U. victoris*, який виявив типовий для всіх екстрактів пригнічуючий ефект у попередньому експерименті (рис. 1). При цьому стандартною концентрацією вважали 50 мМ розчин CaCl<sub>2</sub>, при якому вихід трансформантів приймали за 100 %. При використанні розчинів з концентраціями 100, 200 та 300 мМ вихід трансформантів становив 87,6; 202 та 223 % відповідно порівняно з умовним контролем. Присутність екстракту *U. victoris* знижувала вихід трансформантів до 23,1 % при стандартній концентрації CaCl<sub>2</sub> (50 мМ) та до 3,36; 3,14 і 72,4 % при концентраціях 100, 200 та 300 мМ стосовно відповідних показників для цих же варіантів без екстракту (рис. 2).

За умов цього експерименту пригнічуюча дія екстракту *U. victoris* достовірно посилювалася до

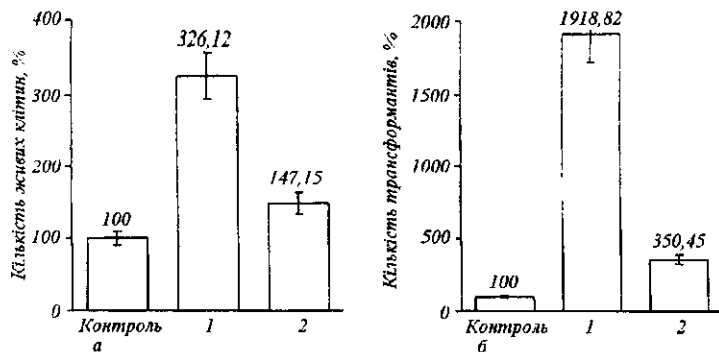


Рис. 3. Залежність рівнів виживання (а) та виходу трансформантів (б) від наявності солей у складі інкубаційної суміші (контроль — 50 мМ CaCl<sub>2</sub>) 1 — 40 мМ CaCl<sub>2</sub> + 10 мМ RbCl; 2 — 40 мМ CaCl<sub>2</sub> + 10 мМ BaCl<sub>2</sub>

концентрації CaCl<sub>2</sub> 200 мМ і теж достовірно знижувалася при концентрації цієї солі 300 мМ. Очевидно, в останньому випадку процес формування пор за рахунок злипання фосfolіпідних ділянок мембран переважав над протилежно направленою активністю екстракту *U. victoris*.

Із речовин та факторів, вплив яких на ефективність трансформації добре відомий [16, 17], можна насамперед назвати солі Rb та Ba. Ми проаналізували ефект додавання цих солей для того, щоб порівняти його з ефектом додаванням рослинних екстрактів. Як можна бачити з рис. 3, додавання невеликої кількості RbCl або BaCl<sub>2</sub> призводить до значного підвищення ефективності трансформації, не зумовленого підвищенням виживання клітин, оскільки збільшення виходу трансформантів набагато перевищує зростання рівня виживання всіх клітин.

Відомо, що проникність мембран, викликана дією комплексу факторів, зокрема холодним кальцієм, супроводжується значною загибеллю клітин [7]. Судячи з того, що виживання у присутності Rb<sup>+</sup> або Ba<sup>2+</sup> не лише не зменшується, але й підвищується, можна припустити, що механізм дії цих додаткових солей не пов'язаний з посиленням пороутворюючих (глибоко нефізіологічних для клітини) перебудов мембран. На цьому тлі присутність іонів Rb<sup>+</sup> та Ba<sup>2+</sup> може впливати не стільки на структурні перебудови в складі клітинної оболонки, скільки на саму ДНК у бік підвищення її проникних можливостей.

Разом з тим дія проаналізованих вище екстрактів має характер, цілком відмінний від ефектів солей Rb та Ba. Так, додавання екстракту викликає зниження, а не підвищення виходу трансформантів, причому це зниження не зумовлене токсичним впливом на клітини, оскільки на прикладі екстракту *U. victoris* продемонстровано чіткий стимулюючий вплив на загальне виживання всієї клітинної популяції (рис. 4).

У ряді робіт показано, що пошкодженість клітин тісно пов'язана з проникністю клітинної обо-

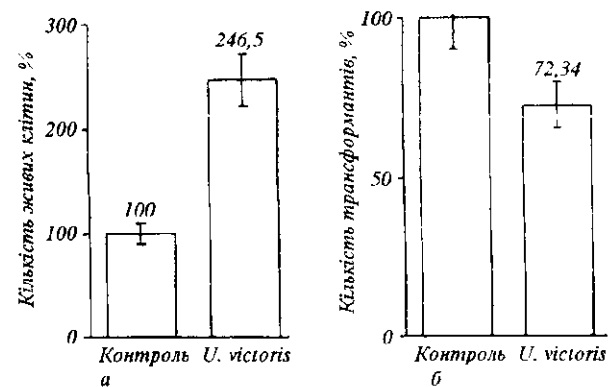


Рис. 4. Вплив екстракту *U. victoris* на загальне виживання клітин (а) та вихід трансформантів (б) порівняно з контролем

лонки для ДНК: чим вища пошкодженість клітин, тим ефективніше клітини поглинають екзогенну ДНК [3, 7]. Не виключено, що екстракти *U. victoris*, *P. ginseng*, *Rh. rosea*, *Rh. rosea* нат. та *P. filicifolia* протидіють процесу ушкодження клітинної оболонки за рахунок взаємодії з фосfolіпідними ділянками мембран, злипання яких лежить в основі пороутворення.

При цьому біологічна активність екстрактів не розповсюджується на плазмідну ДНК, як було показано нами в наступному експерименті. ДНК плазміді *pBR322* обробляли екстрактом *U. victoris* упродовж 30 хв та піддавали рестрикції без попереднього відмивання плазмідної ДНК від екстракту. На рис. 5 можна бачити, що обробка та присутність екстракту *U. victoris* не впливають на електрофоретичний профіль ДНК порівняно з контролем (ДНК, не оброблена екстрактом).

Отже, підсумовуючи наведені вище результати, можна зробити висновок, що випробуваним рослинним екстрактам притаманні чіткі регенеруючі властивості, які проявляються, перш за все, у зменшенні кінцевого виходу трансформантів, а для *U. victoris* було показано, що регенеруючі властивості виявляються також у загальному підвищенні



Рис. 5. Електрофореграма рестрикції ДНК плазмиди *pBR322* дрібнорозщеплюючою рестриктазою *HaeIII*: 1, 2 — ДНК *pBR322*, рестрикована після інкубації її упродовж 30 хв у присутності 50 і 5 %-го екстракту *U. victoris* відповідно; 3 — рестрикована ДНК *pBR322*; 4 — нативна ДНК *pBR322*

виживання ушкоджених жорсткою обробкою клітин завдяки протидії нефізіологічній структурній перебудові мембран у складі клітинної оболонки. Цілком імовірно, що таке підвищення рівня виживання можна очікувати і для решти екстрактів, які в наших досліджах знижували кількість виходу трансформантів.

A. Yu. Myryuta, A. S. Dvornyk, L. P. Mozylevskaia, T. P. Pererva  
Study on plant extract biological activity in the system of *Escherichia coli* transformation by plasmid DNA

#### Summary

The regenerating properties of the extracts derived from the biomass of cultured cells of *Ungernia victoris*, *Panax ginseng*, *Polyscias filicifolia*, *Rhodiola rosea* and *Rhodiola rosea nat.* have been shown in the system of cation-induced *E. coli* transformation by the *pBR322* plasmid. These properties displayed the capability to reduce the transformants yield and the recovery of general cell viability.

A. Ю. Мирюта, А. С. Дворник, Л. П. Можилевская, Т. П. Перерва

Изучение биологической активности растительных экстрактов в системе трансформации *Escherichia coli* плазмидной ДНК

#### Резюме

В системе трансформации хлор-кальциевых компетентных клеток *E. coli* плазмидой *pBR322* показаны регенерирующие свойства экстрактов биомассы культивированных клеток некоторых лекарственных растений. Эти свойства проявлялись

в уменьшении выхода трансформантов и восстановлении жизнеспособности клеток, подвергнутых жесткой обработке.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Alekperov U. K. Plant antimutagens and their mixtures in inhibition of genotoxic effects of xenobiotics and aging processes // *Eur. J. Cancer Prev.*—2002.—11, N 2.—P. 8—11.
2. Нижний С. В., Дмитриева Н. В. Скрининг физиологически активных соединений / Под ред. Л. А. Пирузяна.—М.: Медицина, 1985.—160 с.
3. Сабельников А. Г., Ильяшенко Б. Н. Катионзависимая индукция компетентности бактерий: исследование взаимодействия катионов с клетками *E. coli* // *Молекуляр. генетика.*—1986.—№ 6.—С. 18—25.
4. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике.—М.: Мир, 1976.—460 с.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
6. Урбах В. Ю. Математическая статистика для биологов и медиков.—М.: Изд-во Акад. Наук СССР, 1963.—323 с.
7. Сабельников А. Г., Боровягин В. Л. Трансмембранный перенос ДНК у бактерий, индуцируемый катионами: модель переноса // *Биол. мембраны.*—1988.—5, № 7.—С. 743—751.
8. Гирнык С. А., Древаль В. И. Влияние ионов кальция на флуктуации проводимости бислоиных липидных мембран // *Биол. мембраны.*—1990.—7, № 5.—С. 540—542.
9. Huang R., Reusch R. N. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations // *J. Bacteriol.*—1995.—177, N 2.—P. 486—490.
10. Сабельников А. Г., Моисеева Т. Ф., Авдеева А. В., Ильяшенко Б. Н. Исследование взаимодействия флуоресцентного зонда с поверхностными структурами *Escherichia coli* // *Биофизика.*—1977.—22.—С. 640—645.
11. Действие физиологически активных соединений на биологические мембраны / Под редакцией ....—М.: Наука, 1974.—387 с.
12. Бариляк І. Р., Коркач В. І. Вплив екстракту із ферули на генетичний апарат статевих клітин // *Доп. АН України.*—1993.—№ 10.—С. 153—158.
13. Яремій І. М., Григор'єва Н. П., Мешищен І. Ф. Вплив настою арніки гірської на стан пероксидного окислення ліпідів та захисної глутатіонової системи печінки щурів за умов експериментального токсичного гепатиту // *Укр. біохим. журн.*—1998.—70, № 2.—С. 78—82.
14. Maayumi S., Yukihiko H., Toshihiko O., Harue K., Tsutomu M., Shunro K. Antioxidative and antimutagenic effects of theoflavins from black tea // *Mutat. Res. Mutat. Res. Lett.*—1994.—323, N 1—2.—P. 29—34.
15. Boroveryagin V. L., Sabelnikov A. G., Tarakhovsky Yu. S., Vasilenko I. Polymorphic transitions in membranes of gram-negative bacteria // *J. Membrane Biol.*—1987.—100.—P. 229—242.
16. Hiroaki I., Hiroshi N., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // *Gene.*—1990.—96.—P. 23—28.
17. Тифлова О. А., Леонов П. Г., Карбышева Е. А., Шахнабатян Л. Г. Влияние излучения He-Ne-лазера на плазмидную трансформацию бактерий *Escherichia coli* // *Микробиология.*—1997.—66, № 5.—С. 640—643.

УДК 633.88 + 575.27  
Надійшла до редакції 27.12.02