

13. Соловьева С.С., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков // КТТИ. – 2011. – YI, № 3. – С. 29–40.
14. D.Balicki, E.Beutler. Histone H2A significantly enhances in vitro DNA transfection // Mol Med. –1997. – 3, N 11. – P. 782–787.
15. Y.Lucius, A. Haberland, S.Zaitsev, R.Dalluge, M.Schneider, M.Bottger. Structure of transfection–active Histone H1/ DNA complexes // Molecular Biology Reports. – 2002. – 28. – P. 157–165.
16. Каоуасс М., Beaulieu R., Balicki D. Histonefection: Novel and potent non-viral gene delivery // J. Control Release. – 2006. – 113, N 3. – P. 245–254.
17. Лихачева Л.И., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Гулько Т.П., Кордюм В.А. К вопросу идентификации и изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ, 2013. – 12. – С. 137–140.
18. Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C., Russell G., Holborow E.J.. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy // J. Immun. Meth. – 1982 – 55 – P. 231–242.

ЛИХАЧОВА Л.І., ШПЫЛОВА С.П., ГУЛКО Т.П., РУБАН Т.А., КОРДИУМ В.А.

Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail:kordium@imbg.org.ua

CELLULAR EXTRUSION OF DNA BY MAMMALIAN LEUKOCYTES

Aims. The study of cellular extrusion of DNA of mammalian leukocytes. **Methods.** Leukocytes were isolated from human blood and mice in the capillaries by centrifugation. Human leukocytes and part white blood cells of mice placed onto a slide and fixed. Another portion was applied to mice leukocytes embryonic fibroblasts, after 1.5–2 hour exposure preparations were fixed. The resulting specimens were stained with fluorescent dyes Hoechst 33342 DNA. or Syber-Green and analyzed by standard fluorescence microscopy.

Results. Microscopy results showed that the emissions of DNA from leucocytes into the extracellular space as observed in their monoculture or in the presence of fibroblasts, while the extracellular DNA the nuclei of leukocytes is contacted with the fibroblasts. **Conclusion.** These results demonstrate that mammalian leukocytes may release DNA into the extracellular space as in monoculture and in co-culture with tissue culture cells. It is suggested that the phenomenon described here can serve as described here can serve as.

Key words: cellular extrusion of DNA, extracellular space.

УДК 577.21:577.164.1

ЛУЖЕЦЬКИЙ Т.Б., СЕМКІВ М.В., КШАНОВСЬКА Б.В., ДМИТРУК К.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ПІДВИЩЕННЯ ТЕРМОТОЛЕРАНТНОСТІ ПРОМИСЛОВИХ СПИРТОВИХ ДРІЖДЖІВ ШЛЯХОМ ДЕРЕПРЕСІЇ ГЕНІВ СИНТЕЗУ ТРЕГАЛОЗИ

Етанол на сьогодні є найбільш поширеним рідким паливом, що отримується з поновлювальної сировини – біомаси. Упродовж останніх років об'єм промислового виробництва етанолу зростає за рахунок використання спирту у транспортному секторі. Етанол використовується в автомобільних двигунах як додаток до бензино-етанольних сумішей або у чистому вигляді в спеціалізованих двигунах.

Основним способом отримання етанолу є алкогольна ферментація цукристих субстратів за допомогою спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Перетворення гексоз до етанолу шляхом гліколізу – екзотермічний процес, пов'язаний з вивільненням енергії, що частково

вивільняється у вигляді теплоти. Тому бродильні апарати потребують охолодження до оптимальних температурних умов (34–35 °С) при алкогольної ферментації за участі сахароміцетів. Охолодження промислових ємностей вимагає суттєвих енергетичних затрат. Селекція або конструювання штамів дріжджів *S. cerevisiae* здатних до ефективної алкогольної ферментації при температурах, що перевищують 35 °С, здешевило би отримання спирту за рахунок зниження затрат на охолодження бродильних чанів, а також знизило б різницю температур для подальшої перегонки браги до етанолу. При підвищеній температурі продуктивність алкогольної ферментації зростає. Отже,

конструювання термотолерантних штамів *S. cerevisiae*, що є на сьогодні основними промисловими продуцентами етанолу, є актуальним завданням.

За умов теплового шоку у дріжджів відбувається накопичення дисахариду трегалози, який є стресовим протектором [1]. Синтез трегалози здійснюється ферментним комплексом, що складається з трегалозо-6-фосфатсинтази, що кодується геном *TPS1*, та трегалозо-6-фосфатфосфатази, що кодується геном *TPS2*. Трегалозо-6-фосфатсинтаза каталізує перетворення глюкозо-6-фосфату у комплексі з УДФ-глюкозою до трегалозо-6-фосфату. У свою чергу, трегалозо-6-фосфат перетворюється у трегалозу за участю фермента трегалозо-6-фосфатфосфатази. Посилення експресії одного з цих генів *TPS1* сприяло збільшенню внутрішньоклітинної концентрації трегалози та підвищенню термотолерантності дріжджів *S. cerevisiae* [2]. У даній роботі описано конструювання та біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів *TPS1* та *TPS2*.

Матеріали і методи

У роботі використовували штами дріжджів *S. cerevisiae* раса 13 із колекції мікроорганізмів Інституту біології клітини НАН України та промисловий штам *S. cerevisiae* раса У-563 отриманий з Довжоцького спиртового заводу (село Довжок Кам'янець-Подільського району Хмельницької області). Дріжджі вирощували на багатому середовищі YPD (1 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 2 % глюкоза). Для селекції дріжджових трансформантів YPD середовище містило 200 мг/л генетицину.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Ц80dlacZDM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r⁻, m⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Д(*lacZYA-argF*)U169) вирощували при 37°C на багатому середовищі LB (0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 1 % NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

У роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи [3]. Трансформація дріжджів *S. cerevisiae* проводилася методом електропорації [4]. Активність трегалозо-6-фосфатсинтази, внутрішньоклітинну концентрацію трегалози та термотолерантність визначали як описано в роботах [5, 6]. Для визначення рівня алкогольної ферментації глюкози клітини дріжджів нарощували в багатому середовищі YPD

протягом доби. Біомасу (1,2 мг/мл клітин) переносили в мінеральне середовище YNB з додаванням 10 % глюкози. Ферментація проводилася при температурі 42 °C за умов обмеженої аерації (120 обертів/хв.). Концентрація етанолу в середовищі визначалася за допомогою стандартного набору «Алкотест» [7].

Результати та обговорення

Конструювання вектора для посилення експресії генів *TPS1* та *TPS2* в клітинах *S. cerevisiae* здійснювалося у декілька етапів. Базова плазміда pUC57-delta1_2 містила д-послідовності, що забезпечує мультикопійну інтеграцію модулів експресії в геномі *S. cerevisiae*. д-послідовності *S. cerevisiae* YJRWdelta12 були ампліфіковані за допомогою ПЛР із використанням праймерів SM16(CCG GAA TTC GAC GGG CAG TCT GTT GGA ATA GAA ATC AAC TAT C)/SM17(CAT CAT TTT ATA TGT TTA TAT TCA TCT AGA CCC GGG GTC GAC TTG ATC CTA TTA CAT TAT CAA TCC) та SM18(GGA TTG ATA ATG TAA TAG GAT CAA GTC GAC CCC GGG TCT AGA TGA ATA TAA ACA TAT AAA ATG ATG)/SM19(CCC AAG CTT GAC GGG CAG TCT GAG AAA TAT GTG AAT GTT GAG), поєднані між собою за допомогою ПЛР, що перекривається, використовуючи праймери SM16/SM19. Ампліфікований фрагмент ДНК було оброблено рестриктазами EcoRI і HindIII та клоновано у відповідні сайти у вектор pUC57. Промотор гена *ADHI* (кодує алкогольдегідрогеназу) та термінатор *CYC1* (цитохром C) ампліфікували з геномної ДНК штаму *S. cerevisiae* BY4742 за допомогою праймерів Ko419(CGC GTC GAC TTA ATT AAA GTC CAA TGC TAG)/Ko420(GAT ATC GAC AAA GGA AAA GGG GCG GCC GCG GAT CCC TCG AGT GTA TAT GAG ATA GTT GAT TG) та Ko453(CAA TCA ACT ATC TCA TAT ACA CTC GAG GGA TCC GCG GCC GCC CCT TTT CCT TTG TCG ATA TC)/Ko454(CCC CCC GGG GCA AAT TAA AGC CTT CGA GC) та об'єднали з використанням праймерів Ko419/Ko454. Фрагмент, що містить промотор *ADHI* та термінатор *CYC1* було оброблено рестриктазами SalI і XmaI та клоновано у pUC57-delta1_2. Отриману плазмідну було позначено pUC57-delta1_2-ADHpr-CYCt. ВРТ гена *TPS1* *S. cerevisiae* ампліфікували з використанням праймерів Ko590(CGC GGA TCC ATG ACT ACG GAT AAC GCT AAG GCG)/Ko591(TTT GCG GCC GCT CAG TTT TTG GTG GCA GAG GAG CTT G) та клонували

у сайти *Bam*HI і *Not*I попередньо сконструйованої плазміди. Отриманий вектор позначили *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt*. Ген *kanMX4*, що забезпечує резистентність до антибіотика генетицину, у складі *Sac*I/*Sma*I-фрагмента, обробленого Т4-ДНК-полімеразою, клонували у *Xba*I-лінеаризований та оброблений Т4-ДНК-полімеразою вектор *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt*. Плазміда отримала назву *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt-kanMX*. Для конструювання касети експресії гена *TPS2* промотор *ADH1* та термінатор *CYC1* були ампліфіковані за допомогою праймерів SM23(CCC CCC GGG TTA ATT AAA GTC CAA TGC TAG)/SM24(GAT ATC GAC AAA GGA AAA GGG GAG CTC GGG CCC GGT ACC TGT ATA TGA GAT AGT TGA TTG) та SM25(CAA TCA ACT ATC TCA TAT ACA GGT ACC GGG CCC GAG CTC CCC TTT TCC TTT GTC GAT ATC)/Ko454(CCC CCC GGG GCA AAT TAA AGC CTT CGA GC), об'єднані з використанням праймерів SM23/Ko454 та клоновані в *Xma*I сайт плазміди *pUC57-delta1_2-ADHpr-TPS1-CYCt-kanMX*. ВРТ гена *TPS2* *S. cerevisiae* було ампліфіковано з використанням праймерів SM26(GGT ACC ATG ACC ACC ACT GCC CAA GAC AAT TC)/SM27(GAG CTC TCA AAC CTT TGC GCC GGT GTA AGA AG) та клоновано у сайти *Kpn*I і *Sac*I попередньо сконструйованої плазміди. Кінцева конструкція отримала назву *pdelta-TPS1-TPS2* (рис. 1, А).

Штами що містять гени *TPS1* та *TPS2* від контролем сильного конститутивного промотора гена *ADH1* було одержано шляхом трансформації штамів 13 та У-563 плазмідною *pdelta-TPS1-TPS2*, попередньо обробленою рестриктазою *Ahd*I (при цьому видаляється частина вектора, що відповідає плазміді *pUC57*). Після трансформації клітини висівали на селективне середовище YPD з генетицином (200 мг/л). Колонії здатні рости на селективному середовищі з'являлися після 3 днів інкубації з частотою 100 трансформантів на 1 мкг ДНК. Наявність в одержаних трансформантів ВРТ *TPS1* та *TPS2* під контролем промотора *ScADH1*, а також гена резистентності до генетицину була підтверджена за допомогою ПЛР.

Наступний етап роботи включав проведення фізіологічного та біохімічного аналізу отриманих рекомбінантних штамів *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів *TPS1* та *TPS2*. У отриманих трансформантів було визначено специфічну активність трегалозо-6-фосфатсинтази. Встановлено, що штам 13/*TPS1/TPS2* виявляв підвищену в 6,5 рази активність *Tps1* у порівнянні з вихідним штамом. Активність *Tps1* штаму У-563/*TPS1/TPS2* була підвищена в 23 рази у порівнянні з батьківським штамом (табл.). Підвищена активність свідчить про ефективну експресію цільових генів.

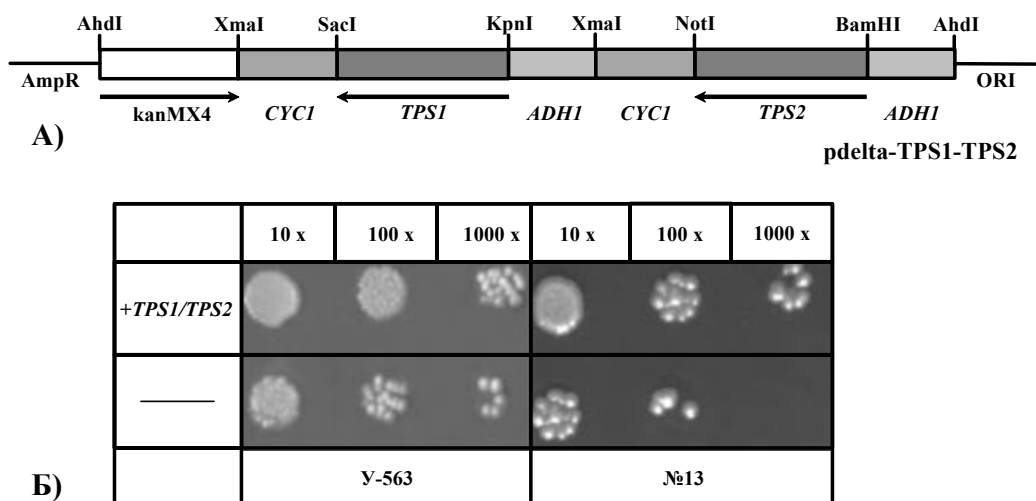


Рис. 1. А) Лінійна схема плазміди *pdelta-TPS1-TPS2*. Гени *kanMX4*, *TPS1*, *TPS2* позначено стрілками, промотор гена *ADH1* та термінатор гена *CYC1* позначено сірими відрізками, *AmpR* – ген *ble*, що забезпечує селекцію бактерійних трансформантів на середовищі в ампіциліном, *ORI* – бактерійна точка початку реплікації (пояснення у тексті). Б) Крапельний тест для визначення термотолерантності дріжджових трансформантів та вихідних штамів після інкубації клітин за умов теплового шоку при 52 °С протягом 30 хв. 10x, 100x, 1000x – розведення клітинної біомаси. Вихідна біомаса становила 0,1 ОГ

У сконструйованих штамів визначали внутрішньоклітинний вміст трегалози. Встановлено, що вміст трегалози отриманих трансформантів на основі штаму 13, підвищений на 50 % у порівнянні з вихідним штамом, тоді як підвищення внутрішньоклітинного вмісту трегалози трансформанта промислового штаму У-563, що містить гени *TPS1* та *TPS2* сягає 2,2 раза у порівнянні з батьківським штамом (табл.).

Термотолерантність сконструйованих рекомбінантних штамів визначали за здатністю до росту після інкубації клітин за умов теплового шоку при 52 °С протягом 30 хв. Було встановлено, що сконструйовані штами з дерепресією генів *TPS1* та *TPS2* виявляли підвищену термотолерантність у порівнянні з вихідними штамми (рис. 1, Б).

Алкогольна ферментація глюкози проводилася при підвищеній температурі (42 °С). Найвищий вихід спирту спостерігали на другу добу ферментації. Максимальна кількість синтезованого етанолу становила 38 г/л у штама 13/*TPS1*/*TPS2*. Підвищення сягало 17 %. Аналогічне підвищення синтезу етанолу

спостерігалося і у трансформанта, похідних штаму У-563, проте максимальна кількість синтезованого етанолу не перевищувала концентрації 31 г/л (табл.). Отримані результати були отримані без врахування випаровування.

Висновки

В результаті проведеної роботи було сконструйовано рекомбінантні штами *S. cerevisiae* з посиленою експресією генів біосинтезу трегалози *TPS1* (кодує трегалозо-6-фосфатсинтазу) та *TPS2* (кодує трегалозо-6-фосфатфосфатазу). Встановлено, що сконструйовані штами характеризуються підвищеним внутрішньоклітинним вмістом трегалози, підвищеною термотолерантністю та підвищеною ефективністю синтезу етанолу на 17 % при температурі 42 °С у порівнянні з батьківськими штамми. Сконструйовані штами є перспективними для впровадження у виробництво.

Робота виконувалась в рамках цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біологічні ресурси і новітні технології біоенергоконверсії», проект № 6–14.

Таблиця. Активність трегалозо-6-фосфатсинтази, Внутрішньоклітинний вміст трегалози та синтез етанолу штамми *S. cerevisiae*

Штам	Активність трегалозо-6-фосфат синтази (нМ/мг/хв)	Внутрішньоклітинний вміст трегалози (нМ/мг)	Етанол (г/л)
13	1,3 ± 0,06	19,9 ± 0,9	31,8 ± 1,6
13/ <i>TPS1</i> / <i>TPS2</i>	8,4 ± 0,4	44,1 ± 2,2	38,3 ± 2,1
У-563	1,5 ± 0,07	9,8 ± 0,5	25,8 ± 1,3
У-563/ <i>TPS1</i> / <i>TPS2</i>	35,2 ± 1,7	13,4 ± 0,7	31,0 ± 1,6

Література

1. Wiemken A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate // Antonie van Leeuwenhoek. – 1990. – 58, N 3. – P. 209–217.
2. An M.Z., Tang Y.Q., Mitsumasu K., Liu Z.S., Shigeru M., Kenji K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase // Biotechnol. Lett. – 2011. – 33. – P. 1367–1374.
3. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 253 p.
4. Thompson J.R., Register E., Curotto J., Kurtz M., Kelly R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. Yeast. – 1998. – 14, N 6. – P. 565–571.
5. Guo Z.P., Zhang L., Ding Z.Y., Shi G.Y. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance // Metabolic Engineering. – 2011. – 13, N 1. – P. 49–59.
6. Ishchuk O., Voronovsky A., Abbas C., Sibirny A. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – 104, N 5. – P. 911–919.
7. Gonchar M.V., Maidan M.M., Sibirny A.A. A new oxidase-peroxidase kit “Alcotest” for ethanol assays in alcoholic beverages // Food Technol. Biotechnol. – 2001. – 39. – P. 37–42.

LUZHETSKYI T.B., SEMKIV M.V., KSHANOVSKA B.V., DMYTRUK K.V., SIBIRNY A.A.

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,

Ukraine, 79005, Lviv, Drahomanova str., 14/16, e-mail: dmytruk@cellbiol.lviv.ua

ELEVATION OF THERMOTOLERANCE OF INDUSTRIAL ETHANOL PRODUCING YEASTS VIA DEREPRESSION OF THE GENES FOR TREHALOSE SYNTHESIS

Aims. The aim of this work is the elevation of the thermotolerance and improvement the efficiency of high temperature alcoholic fermentation of yeast *S. cerevisiae* by overexpression of the genes *TPS1* and *TPS2*.

Methods. For overexpression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase the vector for multicopy integration was constructed, where ORFs of *TPS1* and *TPS2* genes were placed under the control of strong constitutive promoter *ADHI*. The resulting vector was linearized and used for transformation of *S. cerevisiae* industrial strains. **Results.** Recombinant strains overexpressing genes for trehalose synthesis possessed increased intracellular concentration of trehalose. Thermotolerance and efficiency of high temperature alcoholic fermentation of the constructed strains were increased. **Conclusions.** Recombinant strains with higher intracellular trehalose concentration produce 17 % more ethanol during fermentation at 42 °C. Constructed strains are promising for industrial implementation.

Key words: alcoholic fermentation, *S. cerevisiae*, thermotolerance, trehalose.

УДК 581.1:582.475:2

ЛУКИНА А.В.¹, ТРЕТЬЯКОВА И.Н.²

¹ *Красноярская краевая станция юннатов,*

Россия, г. Красноярск, ул. ак. Куренского, 23, e-mail: yunnatu@gmail.com

² *Институт леса им. В.Н. Сукачева,*

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородк, стр. 50, e-mail: culture@ksk.krasn.ru

ФАКТОРЫ ИНДУКЦИИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

Соматический эмбриогенез – стремительно набирающий силу метод биотехнологии, находящий широкое применение в современном лесоводстве. За рубежом созданы плантации из генетически тестированных деревьев, полученных методами клеточной культуры. Программы селекции, сочетающие традиционные подходы и клеточные биотехнологии особенно актуальны. Многочисленными исследованиями, проведенными на разных видах рода *Pinus*, показано, что частота индукции соматического эмбриогенеза остается очень низкой, что значительно ограничивает практическое применение данного метода. Определение условий, влияющих на индукцию соматического эмбриогенеза будет способствовать увеличению числа клеточных линий из которых могут быть получены массовые регенеранты. [1]

Целью нашей работы являлось: выявить факторы, влияющие на индукцию соматического эмбриогенеза у *Pinus sibirica* Du Tour.

Задачи: оценить значение гормонального состава и сахаров в индуцирующей среде на соматический эмбриогенез *P. sibirica*; выявить роль генотипа дерева-донора для индукции

соматического эмбриогенеза

Материалы и методы

В качестве эксплантов использовали зародыши семян, полученных в результате контролируемого (6 деревьев) и свободного опыления (22 дерева). Для стерилизации семена обрабатывали водным раствором перманганата калия в течении 15 минут, затем отмывали в проточной воде и очищали твердые покровы. Далее мегагаметофиты выдерживали в течении 10 минут в гипохлорите натрия, трижды промывали в стерильной дистиллированной воде и помещали на 5 минут в 10 % раствор перекиси водорода. Интактные мегагаметофиты с заключенными в них зародышами, находящимися на предсемядольной стадии развития помещали на питательные среды. Были протестированы 5 питательных сред, различающиеся гормональным составом и сахарами (табл.).

Во все среды добавляли: глутамин 1 г/л, гидролизат казеина 0,5 г/л, мезоинозит 1 г/л, агар 6 г/л.

Результаты введения в культуру фиксировали на 21 и 42 сутки (рис. 1–3). При этом определяли изменение массы эксплантов,