

А.А.Лапин, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Т.И.Комбарова, И.А.Дятлов, В.М.Павлов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ И ВОЗДЕЙСТВИЯ НАЛИДИКСОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНДУКЦИЮ RECА-БЕЛКА В КЛЕТКАХ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15/10

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Изучено влияние УФ-облучения и налидиксовой кислоты на синтез RecA-белка *F. tularensis* 15/10. Получена специфическая мышиная сыворотка к рекомбинантному RecA-белку. По данным иммуноблоттинга со специфической сывороткой, в клетках *F. tularensis* 15/10 после воздействия повреждающих агентов количество RecA-белка не увеличивается.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, ген *recA*, RecA-белок, индукция, гомологичная рекомбинация.

A.A.Lapin, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, T.I.Kombarova, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

Study of the UV Irradiation and Nalidixic Acid Effect on the RecA-protein Induction in *Francisella tularensis* 15/10 Cells

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Studied is the UV irradiation and nalidixic acid effect on the RecA-protein synthesis in *Francisella tularensis* 15/10 cells. Obtained is the specific murine serum to the recombinant RecA-protein. The results of immunoblotting with this specific serum demonstrate that the amount of RecA-protein in *Francisella tularensis* 15/10 cells is not increased after the exposure to these damaging factors.

Key words: *Francisella tularensis*, *recA*-gene, RecA-protein, induction, homologous recombination.

Ключевым ферментом, участвующим в процессе гомологичной рекомбинации и репарации ДНК, является белок RecA – продукт гена *recA* – мультифункциональный фермент, обладающий целым рядом свойств, среди которых ДНК- и АТФ-связывание, АТФ-азная и копротеазная активности [4]. Анализ генома *F. tularensis* LVS из базы данных NCBI (AM233362) позволил обнаружить ген, сходный с геном *recA E. coli*. Молекула RecA-подобного белка *F. tularensis* LVS – продукта *recA*-подобного гена – содержит 359 аминокислот в отличие от молекулы RecA *E. coli* (353 аминокислоты). Воздействие УФ-облучения способствует возникновению разрывов в молекуле ДНК и образованию тиминовых димеров, а воздействие налидиксовой кислоты подавляет репликацию ДНК путем прекращения ее полимеризации [4].

Целью настоящей работы является изучение влияния ультрафиолетового облучения и антибиотика налидиксовой кислоты на индукцию белка RecA в вакцинном штамме *F. tularensis* 15/10.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в таблице.

Штаммы *E. coli* культивировали при температуре 37 °С на жидкой и плотной питательной среде Лурье-Бертани LB и LA [7] с добавлением ампициллина (Ap) до концентрации 100 мкг/мл или без него. Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на плотной среде FT-агар (ФГУН ГНЦ ПМБ) и жидкой питательной среде (FTB) [1]

с добавлением полимиксина (Pm) до концентрации 100 мкг/мл. Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ культивировали при температуре 28 °С на плотной питательной среде Хоттингера, pH 7,2 (ФГУН ГНЦ ПМБ). Приготовление компетентных клеток и трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) проводили по руководству [2].

Культуры клеток *F. tularensis* 15/10 и *E. coli* для индукции RecA белка под действием налидиксовой кислоты растили в жидкой питательной среде до ОП₅₉₅ 1 ед. затем вносили налидиксовую кислоту (Nal) до конечной концентрации 40 мкг/мл и культивировали в течение 90 мин при температуре 37 °С [11].

Для индукции RecA белка под действием ультрафиолетового облучения ночную агаровую культуру *F. tularensis* 15/10 суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) до ОП₅₉₅ 0,2 ед. Полученную суспензию обрабатывали в чашке Петри на УФ-излучателе («Cole Parmer», США) при длине волны 254 нм и постоянном перемешивании. Облучение проводили в течение 10 и 80 с. После обработки отобранную на каждой временной точке суспензию клеток центрифугировали при 12000 об./мин и отмывали в ЗФР. Осадки бактериальных клеток переносили в свежую жидкую питательную среду и культивировали при 37 °С в течении 4 ч без перемешивания.

Стандартные генно-инженерные манипуляции проводили, как описано [2] и согласно инструкции производителей. Ферменты для рестрикции и лигирования были приобретены в фирме «Fermentas» (Литва). Праймеры были синтезированы компанией ЗАО «Синтол». Расчет праймеров проводили с ис-

Штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	Stratagen, США
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	Вакцинный штамм	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
<i>F. tularensis</i> 15/10	Pm ^r , вакцинный штамм	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
<i>F. tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i>	Pm ^r , вакцинный штамм с инактивированным геном <i>recA</i>	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
pET23(b)+	Ap ^r , T7•Tag, His•Tag	Novagen, США
pET23(b)+/ <i>RecA</i> -(His) ₆	Ap ^r , T7•Tag, His•Tag ген <i>recA F. tularensis</i> 15/10	Данная работа
<i>E. coli</i> BL21 pET23(b)+/ <i>RecA</i> -(His) ₆	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B ⁻) <i>gal</i> λ (DE3) Ap ^r , T7•Tag, His•Tag ген <i>recA F. tularensis</i> 15/10	Данная работа

пользованием нуклеотидной последовательности генома *F. tularensis* LVS (AM233362) из банка генов NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и пакета компьютерных программ Vector NTI, 10.0 (США). Сиквенс ДНК проводили на секвенаторе ALF express II (Amersham Pharmacia Biotech, США).

ПЦР проводили на термоциклере Gene Ap PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) с помощью высокоточной полимеразы («Fermentas», Литва) с праймерами Nde-*recA*F1 (CCCCATATGAGTAAAGAAAAGGCGCTAGAATCAG) и R1*RecA*orf(XhoI) (AACTCGAGGATAAGCTCATCTTGAGTAACTGCTGG). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,7 % агарозном геле с использованием 0,04 М Трис-ацетатного буфера с добавлением ЭДТА до 0,002 М (рН 8,0).

Экспрессию рекомбинантного *RecA* белка проводили согласно инструкции производителя вектора pET23b(+). Синтез клонированного белка индуцировали добавлением в культуральную среду изопропил-β-D-галактопиранозид (ИПТГ) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., США) до конечной концентрации 1 мМ с последующим культивированием в течение 2,5 ч. Уровень индукции контролировали с помощью электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Лэммли [5].

Очистку рекомбинантного белка из цитоплазматической фракции штамма-производителя *E. coli* BL21 pET23(b)+/*RecA*-(His)₆ проводили металл-хелатирующей хроматографией в неденатурирующих условиях на носителе Ni²⁺NTAHisBind® Superflow™ (Pharmacia Biotech, Швеция). Полученные фракции анализировали электрофорезом в 12,5 % ПААГ, объединяли, диализовали против 20 мМ Трис-HCl-буфера (рН 8,0) в присутствии 5 мМ ДТТ при комнатной температуре и хранили при температуре 14 °С.

Молекулярную массу белков определяли по сканированному изображению электрофореграммы с помощью программы PhotoCaptMW с использованием набора стандартных маркеров молекулярной массы для электрофореза («Fermentas», Латвия). Количество белка оценивали по методу Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [6]. Вестерн-блоттинг проводили по методу [10]. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили согласно руководству [8].

Мышиные антисыворотки к рекомбинантному белку *RecA* были получены трехкратной подкожной иммунизацией белых нелинейных мышей 20 мкг белка *RecA*-(His)₆ с интервалом в 21 день.

Результаты и обсуждение

Ампликон с геном *recA* получали с использованием праймеров Nde-*recA*F1 и R1*RecA*orf(XhoI) и ДНК *F. tularensis* 15/10 в качестве матрицы. Ампликон размером 1077 п.о. обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI и встраивали в линейаризованную векторную плазмиду pET23(b+). Полученную рекомбинантную плазмиду pET23(b)+/*RecA*-(His)₆ переносили в клетки штамма *E. coli* BL21 методом кальциевой трансформации. Отбор трансформированных клеток *E. coli* BL21, несущих плазмиду (pET23(b)+/*RecA*-(His)₆), проводили по признаку устойчивости к ампициллину и наличию фрагмента хромосомной ДНК *F. tularensis* 15/10 с копией гена *recA* с помощью ПЦР, используя праймеры Nde-*recA*F1 и R1*RecA*orf(XhoI).

Клонированный ген *recA* секвенировали для проверки ошибок в открытой рамке считывания, возникающих в процессе ПЦР-амплификации и клонирования в вектор, биоинформационный анализ транслированной рамки считывания секвенированного гена *recA F. tularensis* 15/10 не выявил изменений по отношению к гену *recA F. tularensis* LVS (AM233362). Молекулярная масса рекомбинантного *RecA* белка, рассчитанная с использованием пакета программ Vector NTI 10.0, составляла 39801,94 Да.

Анализ уровня синтеза рекомбинантного белка *RecA*-(His)₆ в полученных клонах *E. coli* BL21(pET23(b)+/*RecA*-(His)₆) после индукции ИПТГ показал наличие основной белковой полосы с кажущейся молекулярной массой около 42 кДа (рис. 1 А, показано стрелками).

Клон *E. coli* BL21(pET23(b)+/*RecA*-(His)₆) после секвенирования гена *recA* использовали для получения белка *RecA*-(His)₆. Выделенный и очищенный металл-хелатирующей хроматографией в неденатурирующих условиях гомогенный препарат белка с кажущейся молекулярной массой (42,9±1,9) кДа и чистотой около 80 % (рис. 1, Б) использовали для получения специфической антисыворотки. Средний

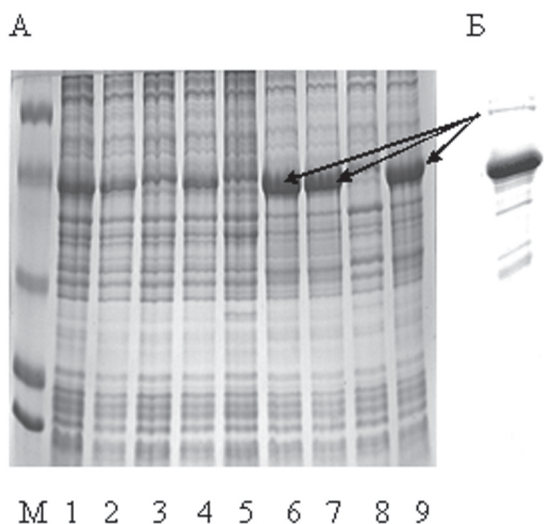


Рис. 1. Электрофореграмма клеточных лизатов *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) до и после внесения ИПТГ для индукции синтеза рекомбинантного белка RecA-(His)₆:
 А. М – набор стандартных белков «Fermentas» (66, 45, 24, 18,4 и 14,4 кДа); 1–4 – *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) до индукции; 5 – *E. coli* BL21; 6–9 – *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) после индукции. Б. Очищенный рекомбинантный белок RecA-(His)₆.

титр антител к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ составлял 1:3016.

Способность антисыворотки к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ специфически связываться с нативным белком RecA оценивали иммуноблоттингом с использованием клеточных лизатов родительского и мутантного штаммов *F. tularensis* 15/10 и *F. tularensis* 15/10Δ*recA*, а также *E. coli* и *Y. pestis*. Иммуноблоттинг показал (рис. 2), что полученная нами антисыворотка к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ выявляет по одной основной полосе в препаратах рекомбинантного белка RecA-(His)₆ (молекулярная масса ~ 44 кДа) и в лизате клеток исходного штамма *F. tularensis* 15/10 (молекулярная масса), свидетельствуя о специфичном распознавании соответствующих эпитопов в молекуле нативного туляремийного белка RecA. Следует отметить некоторое расхождение между рассчитанной (38831,12 Да) и кажущейся (~ 43 кДа) молекулярными массами нативного белка RecA.

Кроме того, отсутствие видимых полос в треке штамма *F. tularensis* 15/10Δ*recA* с удаленным геном *recA* подтверждает неспособность бактериальных клеток к синтезу белка RecA, обусловленное делецией гена *recA*. Обращает на себя внимание наличие полос молекулярной массы ~ 38 кДа в лизатах клеток *E. coli* и *Y. pestis* (рис. 2, линии 1 и 4), что может свидетельствовать о том, что в молекулах RecA белков *E. coli* и *Y. pestis* присутствуют общие с белком RecA туляремийного микроба эпитопы, поскольку рассчитанные молекулярные массы RecA белков *E. coli* и *Y. pestis* составляют 37971,18 и 37854,10 Да соответственно.

Влияние УФ-облучения на индукцию синте-

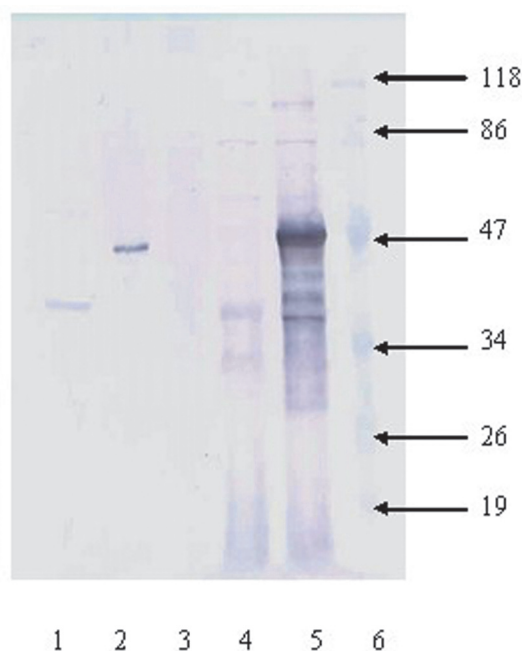


Рис. 2. Специфичность антисыворотки к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ (10 % Ds-Na-ПААГ):

1 – *Y. pestis* EV; 2 – *F. tularensis* 15/10; 3 – *F. tularensis* 15/10Δ*recA*; 4 – *E. coli* BL21; 5 – рекомбинантный белок RecA-(His)₆; 6 – окрашенные маркеры «Fermentas» (118, 86, 47, 34, 26 и 19 кДа)

за RecA белка в клетках *F. tularensis* 15/10 изучали воздействием ультрафиолетового облучения при двух вариантах экспозиции – 10 и 80 с. По результатам высевок выживаемость клеток после облучения в течение 10 с составила 90 %, а при экспозиции 80 с – всего 10 %. Уровень индукции синтеза белка RecA в пробах, отобранных в различные временные интервалы в диапазоне 0–4 ч после облучения, был оценен с помощью иммуноблоттинга с полученной поликлональной мышинной антисывороткой к рекомбинантному RecA белку. На рис. 3 (А) приведен иммуноблоттинг проб, полученных при экспозиции 80 с. Визуальная оценка интенсивности окраски соответствующих треков для проб, отобранных в разные временные интервалы после воздействия УФ-облучения, не позволяет выявить в них явных отличий, что может свидетельствовать об отсутствии детектируемого уровня индукции белка RecA.

Уровень синтеза белка RecA при воздействии NaI в течение 90 мин оценивали с помощью иммуноблоттинга с той же мышинной антисывороткой (рис. 3, Б). Анализ данных позволяет считать, что в клетках *F. tularensis* синтез белка RecA не индуцируется. Интенсивность окраски соответствующей белковой полосы до обработки (рис. 3, Б, линия 3) не отличается от таковой после воздействия NaI (рис. 3, Б, линия 4).

Результаты, полученные с помощью иммуноблоттинга, свидетельствуют о том, что синтез белка RecA в клетках *F. tularensis*, по-видимому, является конститутивным и не индуцируется под воздействи-

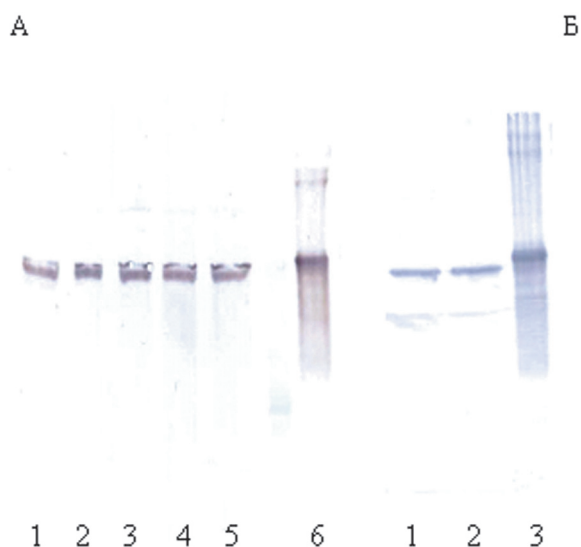


Рис. 3. Индукция белка RecA под действием УФ-облучения (А) и налидиксовой кислоты (Б) (10 % Ds-Na-ПААГ):

А. Клетки *F. tularensis* 15/10: линия 1 – 0 с, 2 – 30 мин, 3 – 1 ч, 4 – 2 ч, 5 – 4 ч; 6 – белок RecA-(His)₆. Б. 1 и 2 – клетки *F. tularensis* 15/10 до и после воздействия налидиксовой кислоты; 3 – белок RecA-(His)₆.

ем УФ-облучения и налидиксовой кислоты,

Как известно, белок RecA является центральным компонентом системы SOS индукции, способствующей восстановлению поврежденной ДНК бактериальной клетки, не только из-за непосредственного участия в процессе репарации ДНК, но и в экспрессии других генов, функции которых направлены на сохранение жизнеспособности бактерий после любого повреждающего воздействия. Показано, что при повреждении ДНК микобактерий индукция экспрессии гена белка RecA проходила с разной скоростью и была значительно замедлена у *Mycobacterium tuberculosis* по сравнению с *M. smegmatis*. Авторы считают, что замедление индукции может быть обусловлено вовлечением других факторов, и такой механизм обуславливает адаптационное преимущество патогенному микроорганизму в обеспечении более длительной защиты от агрессивного противодействия иммунной системы макроорганизма [9]. Возможно, что подобный механизм, являющийся объектом нашего дальнейшего исследования, лежит и в основе выявленного нами отсутствия индукции белка RecA

в клетках *F. tularensis*. Кроме того, представляет интерес и изучение причин расхождения рассчитанной и кажущейся молекулярных масс нативного белка RecA, которое может быть обусловлено его посттрансляционной модификацией [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):66–7.
2. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Изд-во Мир; 1984. 480 с.
3. Fischer W., Haas R. The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. J. Bacteriol. 2004; 186(3):777–84.
4. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 1994; 58(3):401–65.
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London). 1970; 227:680–685.
6. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol. J. Biol. Chem. 1951; 193:115–9.
7. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Gold Harbor Laboratory; 1972.
8. Ngo T.T., Lenhoff H.M., editor. Enzyme-mediated immunoassay. New York, London: Plenum Press; 1988. 444 p.
9. Papavinasasundaram K.G., Anderson C., Brooks P.C., Thomas N.A., Movahedzadeh F., Jenner P.J. et al. Slow induction of RecA by DNA damage in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 2001; 47:3271–9.
10. Towbin H., Staenelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76(9):4350–4.
11. Weinstock G.M., McEntee K.M., Lehman I.R. ATP-dependent renaturation of DNA catalyzed by the recA protein of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76(1):126–30.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 4(102):66–7.
2. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. Moscow: Izd. "Mir"; 1984. 480 p.

Authors:

Lapin A.A., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Лапин А.А., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболensk, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 13.05.11.