

УДК 573.663

**ВЛИЯНИЕ БАЗАЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ
ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *SERRATIA MARCESCENS*
НА СТАБИЛЬНОСТЬ И КОПИЙНОСТЬ ПЛАЗМИД *pHISNUCSMA*
В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI***

*О.А. Гимадуудинов, Е.В. Крякунова,
Р.Г. Хамидуллина, Б.И. Барабаничиков*

Аннотация

В работе были определены активности мутантных нуклеаз *Serratia marcescens* при базальном уровне экспрессии их генов, находящихся в плазмиде *pHisNucSma*. Установлена обратная корреляция между элиминацией плазмид *pHisNucSma* и активностью эндонуклеаз *S. marcescens* при базальном уровне экспрессии их генов. Показано, что чем выше уровень активности мутантных эндонуклеаз *S. marcescens*, тем выше устойчивость рекомбинантных штаммов к ампициллину. Выявлена корреляция между уровнем устойчивости к ампициллину, активностью β -лактамазы и количеством копий плазмид *pHisNucSma* в рекомбинантных штаммах *E. coli* TGE900.

Ключевые слова: эндонуклеаза, β -лактамаза, плаزمид, элиминация плазмид, копияность плазмид.

Введение

В настоящее время методы генетической инженерии применяются для решения широкого круга задач в области молекулярной биологии и биотехнологии. Одной из таких задач, наиболее часто реализуемой на практике, является создание на основе технологии рекомбинантной ДНК штаммов, обладающих способностью синтезировать в большом количестве необходимый белок. Такой сверхсинтез может осуществляться в результате как повышения дозы гена, так и увеличения его транскрипционной активности [1]. Векторная ДНК придает клетке-хозяину новые свойства, дающие ей селективные преимущества. Однако репликативный синтез плазмидной ДНК, сверхсинтез продукта чужеродного гена являются дополнительной метаболической нагрузкой для клетки-хозяина [2], поэтому в неселективных условиях плазмиды могут элиминироваться из клетки. В связи с этим для поддержания высокого уровня генной экспрессии чужеродной ДНК очень важной является проблема стабильности вектора.

Эндонуклеаза *Serratia marcescens* в последние годы находит широкое применение в биохимических исследованиях, молекулярной биологии, медицине и сельском хозяйстве. Возрастающие потребности в препарате вызывают необходимость в исследованиях, направленных на получение новых сверхпродуцентов этого фермента и изучение его свойств [3, 4]. Фермент может быть использован для деградации ДНК и РНК, очистки белков, может служить моделью

для исследования механизмов транспорта белков из клетки во внеклеточную среду у грамотрицательных бактерий [5].

Для некоторых представителей семейства родственных нуклеаз показано участие в процессах, включающих размножение праймеров для репликации митохондриальной ДНК посредством более предпочтительного расщепления GC-богатых последовательностей, содержащихся в транскриптах консервативной последовательности *block II (CSBII)* в участке *D*-петли *mtDNA* и в области перед митохондриальным геном *tRNA^{Phe}* в случае бычьей нуклеазы *EndoG* [6], репарации и рекомбинации ДНК в случае *Nuc1* [7] и, по-видимому, трофическую функцию для внеклеточных нуклеаз *Anabaena* sp. и *Serratia marcescens*. Внеклеточная эндонуклеаза *S. marcescens* обладает избирательностью расщепления отдельных фосфодиэфирных связей в молекуле субстрата. Как в одноцепочечной, так и в двуцепочечной ДНК в первую очередь расщепляются GC-богатые районы, а последовательности, обогащенные АТ-парами, разрушаются с гораздо меньшей скоростью [8]. ДНК/РНК гибриды, в свою очередь, являются лучшими субстратами вероятно потому, что нити ДНК в гибридном дуплексе проявляют общую А-подобную конформацию [9].

Цель настоящей работы – определить влияние базального уровня экспрессии эндонуклеазы *Serratia marcescens* на стабильность и копийность плазмид *pHisNucSma* в клетках рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*.

1. Материалы и методы

1.1. Объекты исследования. В работе были использованы штаммы *Escherichia coli* TGE900 и LK111λ, несущие плазмиды *pHisNucSmaHis89Ala*, *pHisNucSmaArg57Ala* и *pHisNucSma*wt. В этих плаزمидах мутантные варианты генов эндонуклеазы *Serratia marcescens* находятся под контролем P_L-промотора фага λ, а транскрипционная активность регулируется термочувствительным C1-репрессором (рис. 1) [4].

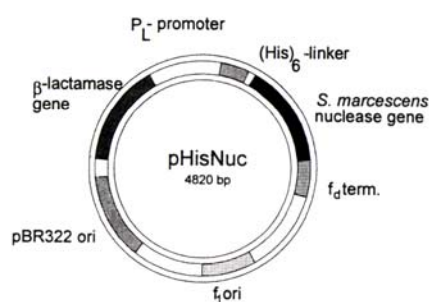


Рис. 1. Конструкция плазмиды *pHisNucSma*

1.2. Питательные среды. Для выращивания штаммов микроорганизмов использовались жидкая и твердая LB-среды [11].

Для создания селективных условий при культивировании рекомбинантных штаммов в LB-среду вносили ампициллин в концентрации 150 мкг/мл.

Плазмидная ДНК выделялась из клеток штаммов LK111λ по стандартной методике [11].

Для проведения электрофореза использовалась 1%-ная агароза в трис-бонатном буфере, pH 8.0 [12].

Компетентные клетки бесплазмидного штамма *E. coli TGE900* получали по методике [13].

Для трансформации клеток-хозяев использовали метод теплового шока [14].

Для индукции генов эндонуклеазы ночную культуру клеток, выращенную при 30 °C на LB-агаре, высевали в 10 мл LB-бульона и инкубировали 4–5 ч при 30 °C, после чего температуру культивирования повышали до 42 °C и инкубировали в течение 2 ч. Затем отбирали 1 мл культуры, осаждали центрифугированием, надосадок удаляли, а к осадку добавляли 50 мкл буфера для нанесения проб и кипятили в течение 8 мин на кипящей водяной бане.

Разделение белков проводили по стандартной методике [12].

1.3. Элиминация плазмид с помощью этидиум бромид. К 4.9 мл LB-бульона добавляли 0.1 мл свежееобновленной культуры, выращенной в LB-бульоне, и этидиум бромид в концентрациях 50 и 200 мкг/мл. После 18-часового инкубирования бактерий при 28 °C делали высева по 0.1 мл культуры из разных разведений на чашки с LB-агаром. Параллельно производили высева культуры, не обработанной элиминирующим агентом. Выросшие отдельные колонии перекалывали на чашки с LB-агаром с добавлением ампициллина в концентрации 125 мкг/мл. Об элиминации судили по потере клетками признака устойчивости к ампициллину.

1.4. Определение активности неспецифических нуклеаз с помощью индикаторного агара. Индикаторная среда готовилась по методике, предложенной Майсс с соавт. [15].

К 100 мкл пробы, отобранной до начала лизиса культуры, добавляли 10 мкл лизата, отобранного через 10 мин после начала лизиса. Лизис клеток проводили лизоцимом в концентрации 0.2 г/мл при температуре 37 °C. На чашки с индикаторной средой наносились 10 мкл пробы и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Активность нуклеазы на индикаторной среде определяли по формуле:

$$A = \pi r^2, \quad (1)$$

где A – активность нуклеазы; r – радиус зоны с измененной окраской индикаторной среды.

1.5. Определение уровня резистентности к антибиотикам. В чашки Петри заливали LB-агар с градиентом антибиотика. Засевали на следующий день петлей с культурой клеток по направлению к максимальной концентрации антибиотика. Инкубировали в течение ночи при 28 °C.

0.1 мл культуры в стационарной фазе роста, разведенной в физиологическом растворе ($4 \cdot 10^3$ – $6 \cdot 10^3$ бактериальных клеток), высевали на LB-агар, содержащий различные концентрации ампициллина (± 500 мкг/мл от точки прекращения роста на чашках). За уровень резистентности принимали минималь-

ную концентрацию антибиотика, при которой не происходило видимого роста через 18–20 ч инкубирования при 28 °С [16].

1.6. Определение активности β-лактамазы. Культуру клеток выращивали в течение 18 ч при 28 °С в 50 мл LB-бульона. В качестве контроля были взяты клетки бесплазмидных штаммов *TGE900*. Клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 25 мин. Осадок ресуспендировали в 5 мл буфера TES следующего состава: 0.1 М NaCl; 10 мМ трис-HCl; 1 мМ ЭДТА; pH 7.8 и доводили оптическую плотность образцов на ФЭК до величины $A_{530} = 0.18$. Отбирали 10 мл и разрушали клетки с помощью лизоцима в концентрации 0.2 г/мл при 37 °С в течение 1 ч. Затем к полученной вязкой субстанции добавляли ДНКазу в концентрации 0.1 мкг/мл и выдерживали 30 мин при 37 °С до исчезновения вязкости.

Йодометрическое титрование проводилось по методике, предложенной С. Перрет[17].

β-лактамазную активность рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{(V_1 - V_2) \cdot k \cdot T \cdot 10 \cdot d}{F \cdot 60 \cdot 2 \cdot 1}, \quad (2)$$

где x – условные единицы активности β-лактамазы; V_1 – количество 0.01 н. раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование в контрольном опыте, мл; V_2 – количество 0.01 н. раствора гипосульфита натрия, пошедшего на титрование исследуемого раствора, мл; k – поправка 0.01 н. раствора гипосульфита натрия (1); T – теоретическая активность натриевой (1667 ед/мл) или калиевой (1600 ед/мл) солей бензилпенициллина; d – степень разведения основного раствора, содержащего β-лактамазу; F – количество 0.01 н. раствора йода, поглощаемого 1 мг бензилпенициллина (для натриевой соли – 2.26, для калиевой соли – 2.15), мл; множитель «10» – коэффициент разведения исходной суспензии объемом 1 мл, к которой добавлено 9 мл раствора бензилпенициллина; множитель «60» – количество единиц пенициллина, инактивируемого 1 ед. пенициллиназы за 60 мин при 37 °С; множитель «2» – количество испытуемого раствора, взятого для испытания, мл; множитель «1» – объем раствора, взятого для определения активности в 1 мл.

2. Результаты и обсуждения

С развитием техники рекомбинантной ДНК и выяснением механизмов регуляции активности генов появилась возможность создавать генноинженерные конструкции, содержащие структурные гены донора ДНК и регуляторные последовательности из генома реципиента, что способствует эффективной экспрессии структурных генов в гетерологичной системе клетки [18]. Но даже в отсутствие индуктора существует определенный базальный уровень выражения гена, он может быть ниже (в присутствии большего количества белка-репрессора) или выше (если количество белка-репрессора уменьшено) среднего базального уровня [19].

В качестве клетки-хозяина при создании рекомбинантных штаммов широко используется бактерия *Escherichia coli*. Ее генетическая система хорошо изуче-

на на молекулярном уровне, она легко идентифицируется, обладает высокой скоростью роста. Кроме того, *E. coli* способна секретировать чужеродные белки во внешнюю среду [20].

2.1. Введение плазмидной ДНК в клетки *Escherichia coli* методом трансформации. Экспериментально доказано, что в процессе плазмидной трансформации *E. coli* критическую роль играет состояние липидов мембраны клеток [14]. Фазовый переход липидов мембраны из двухслойной в гексагональную конформацию происходит во время температурного шока клеток и сопровождается поглощением экзогенных двуцепочечных молекул ДНК [21]. Показано, что при тепловом шоке (быстрое нагревание от 0 до 37 °С) поглощение ДНК продолжается лишь в течение 20 с [14]. Если после нагревания смесь клеток и ДНК снова охладить до 0 °С, то в процессе индуцируемого фазового перехода липидов молекулы ДНК смогут опять проникать в клетки, при этом время проникновения ДНК продолжительнее. Выявленные фазовые переходы липидов приводят к нарушению структуры внешней мембраны, но практически не затрагивают цитоплазматическую мембрану [22].

На первом этапе трансформации экзогенная ДНК независимо от ее природы связывается с компетентными клетками, по-видимому, на определенных рецепторных участках поверхности бактерии [23]. Для этого фрагмент ДНК вначале прикрепляется к клетке немногими точками, большая часть ДНК остается свободной. Затем происходит нарезание молекулы ДНК на фрагменты, обусловленное действием особой эндонуклеазы, требующей для своей работы наличие ионов магния [24]. После этого одна цепь молекулы ДНК разрушается, а другая проникает в клетку, гидролизуясь с концов [25].

Культура *E. coli* обладает различной способностью к трансформации в разные периоды роста. В самом начале и конце роста культуры трансформантов почти не возникает. Наибольшее их число образуется, если берут клетки в середине-начале логарифмической фазы роста [18].

Клетки штамма *E. coli* TGE900, чувствительные к ампициллину и не обладающие нуклеазной активностью, трансформировались плазмидами *pHisNucSmaHis89Ala*, *pHisNucSmaArg57Ala* и *pHisNucSma^{wt}*, которые содержат гены эндонуклеазы *S. marcescens*, кодирующие ферменты с различной активностью. В этих генах замена гистидина в положении 89 на аланин (*His89Ala*) в гене эндонуклеазы *Serratia marcescens* делает белок дефектным по каталитической функции. При замене аргинина в положении 57 на аланин (*Arg57Ala*) ферментативная активность белка понижается на 65% [10]. Данные плазмидные ДНК были ранее выделены из рекомбинантных штаммов *E. coli* LK111λ, в которых промотор гена эндонуклеазы является неиндуцибельным в отличие от штаммов TGE900. Для доказательства наличия плазмидной ДНК в полученных образцах был проведен электрофорез (рис. 2).

В результате клонирования трех вариантов плазмид, несущих экспрессирующиеся на базальном уровне гены эндонуклеазы *S. marcescens* с разными активностями, нами были отобраны клоны, которые приобрели устойчивость к ампициллину. В качестве контроля была проведена трансформация бесплазмидного штамма *E. coli* TGE900 физиологическим раствором, не содержащим ДНК.

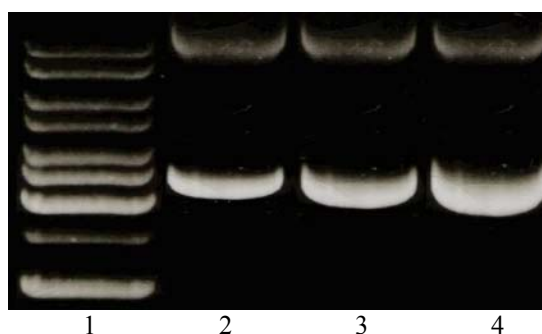


Рис. 2. Электрофоррограмма плазмидной ДНК *pHisNucSma*, взятой для трансформации: 1 – маркер нуклеиновых кислот фирмы *Fermentas 1 kb DNA Ladder*; 2 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli* *LK111λ pHisNucSmaHis89Ala*; 3 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli* *LK111λ pHisNucSmaArg57Ala*; 4 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli* *LK111λ pHisNucSmawt*

2.2. Доказательства введения плазмидной ДНК в клетки *E. coli*. Существует несколько методов доказательства введения чужеродной ДНК в клетку, основанных на изменении свойств штамма-хозяина. В данной работе были использованы следующие методы: индукция синтеза эндонуклеазы под действием температуры с последующим электрофоретическим разделением белков и элиминация плазмид.

2.2.1. Индукция синтеза эндонуклеазы *S. marcescens* под действием температуры. Так как температурочувствительный белок-репрессор С1 инактивируется при повышенной температуре, проводилась индукция экспрессии гена эндонуклеазы *S. marcescens* под действием температуры. Как видно из рис. 3, индукция под действием температуры приводит к значительному увеличению синтеза внеклеточной эндонуклеазы. Известно, что в результате такой индукции выход очищенного белка нуклеазы составляет более 30 мг из 1 л культуральной жидкости. В результате такого сверхсинтеза нуклеазы белок переходит в нерастворимую форму, образуя связанные с мембранами агрегаты [4].

При температуре инкубации 28 °С у всех рекомбинантных штаммов не наблюдалось индукции синтеза эндонуклеазы *S. marcescens*. Максимальный уровень индукции синтеза эндонуклеазы *S. marcescens* достигается при температуре инкубации рекомбинантных штаммов 42 °С. Это подтверждается данными электрофоретического анализа белков культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *E. coli*. Как видно из рис. 3, после индукции при температуре 42 °С у рекомбинантных штаммов значительно увеличивается количество белка в зоне, соответствующей положению белка эндонуклеазы (29 kDa), тогда как у неиндуцируемых рекомбинантных штаммов такого увеличения не наблюдается.

2.2.2. Элиминация плазмид с помощью этидиум бромид. Для выяснения того, насколько стабильно данная плазида наследуется в ряду клеточных поколений, а также для доказательства того, что изменения в уровне резистентности к антибиотику у рекомбинантных штаммов не связаны с мутациями самого штамма-хозяина или с транспозицией гена устойчивости из плазмиды в хромосому, необходимо показать, что вместе с утратой плазмиды происходит и утрата способности расти на средах с ампициллином. Для этого нами проводилась

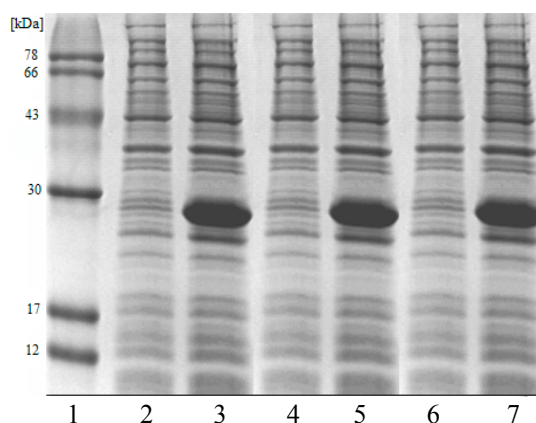


Рис. 3. Электрофоррограмма белков, выделенных из рекомбинантных штаммов *E. coli* TGE900 до и после индукции гена эндонуклеазы: 1 – белки-стандарты “Merck IV”; 2 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmaHis89Ala* (нет индукции); 3 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmaHis89Ala* (индукция); 4 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmaArg57Ala* (нет индукции); 5 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmaArg57Ala* (индукция); 6 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmawt* (нет индукции); 7 – белки из *E. coli* TGE900 *pHisNucSmawt* (индукция)

элиминация плазмид *pHisNucSma* из рекомбинантных штаммов *E. coli* TGE900 при помощи этидиум бромида.

Сущность метода элиминации заключается в том, что с помощью специальных агентов штаммы бактерий исцеляются от плазмиды и приобретают свои исходные свойства [26]. Общий принцип действия этих агентов (в нашем случае EtBr) заключается в том, что они нарушают распределение плазмидных копий ДНК между дочерними клетками, ингибируя начало репликации, что ведет к тому, что часть из них оказывается лишенной плазмиды.

Как известно, *origin*-сайты, ответственные за начало репликации ДНК, богаты АТ-парами и образуют В-форму ДНК. Интеркаляция молекулы EtBr в *origin*-сайт должна привести к изменению угла между плоскостью оснований и осью двойной спирали ДНК, что индуцирует переход из В-формы в А-форму ДНК, характерную для GC-богатых последовательностей [27]. По-видимому, ДНК-топоизомеразы, работа которых необходима для инициации репликативного синтеза, не опознают топологически измененную область *origin*, что ведет к ингибированию процесса начала репликации плазмид и к нарушению передачи их копий из родительских клеток в дочерние.

Известно, что эндонуклеаза *S. marcescens* предпочтительно расщепляет А-форму ДНК по сравнению с В-формой [8]. Возможно, что нуклеаза разрезает область *origin*, модифицированную бромистым этидием в А-форму, тем самым заменяя иницирующее репликацию действие ДНК-топоизомеразы.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, обработка этидиум бромидом приводит к снижению выживаемости бактерий. Выжившие клетки анализировали на потерю маркера устойчивости к ампициллину. Из табл 2 видно, что с увеличением концентрации этидиум бромида происходит увеличение процента элиминации, однако у рекомбинантного штамма *E. coli* TGE900 *pHisNucSmaHis89Ala* утрата плазмид происходит с более высокой частотой,

Табл. 1

Выживаемость рекомбинантных штаммов *E. coli* под действием этидиум бромид

Штамм	Концентрация <i>EtBr</i> , мкг/мл	Выживаемость, %
<i>TGE900 pHisNucSmaHis89Ala</i>	0	100
	50	27.33
	200	1.36
<i>TGE900 pHisNucSmaArg57Ala</i>	0	100
	50	2.15
	200	0.04
<i>TGE900 pHisNucSmawt</i>	0	100
	50	1.35
	200	0.006

Табл. 2

Элиминация плазмид из клеток *E. coli TGE900* под действием этидиум бромид

Штамм	Концентрация <i>EtBr</i> , мкг/мл	Утрата устойчивости к Amp, %
<i>TGE900 pHisNucSmaHis89Ala</i>	0	57.7
	50	100
	200	100
<i>TGE900 pHisNucSmaArg57Ala</i>	0	12
	50	20
	200	68
<i>TGE900 pHisNucSmawt</i>	0	7
	50	9
	200	28

чем у двух других штаммов. Плазмиды *pHisNucSmaArg57Ala* элиминируют с меньшей частотой, чем плазмиды *pHisNucSmaHis89Ala*, но с большей по сравнению с плазмидами *pHisNucSmawt*. Это, по-видимому, можно объяснить следующим образом. Известно, что в популяции бактерий имеются клетки, у которых белок-репрессор C1 может быть непрочно связан с операторным участком P_L-промотора, и поэтому возможна транскрипция гена эндонуклеазы *S. marcescens*, находящегося под контролем P_L-промотора (базальный уровень экспрессии гена). Поскольку мутантный белок *His89Ala* не обладает нуклеазной активностью, а мутант *Arg57Ala* имеет лишь 35%-ную активность нуклеазы по сравнению с исходным белком (дикий тип) [10], то полученные нами результаты указывают на то, что существует обратная корреляция между активностью эндонуклеазы и элиминацией плазмид.

Идентификацию плазмидной ДНК проводили с помощью электрофореза. Как видно из рис. 4, плазмидная ДНК присутствовала только в клетках, выросших в селективных условиях, тогда как в клетках, утративших маркер устойчивости к ампициллину после действия этидиум бромид, плазмидная ДНК не была выявлена.

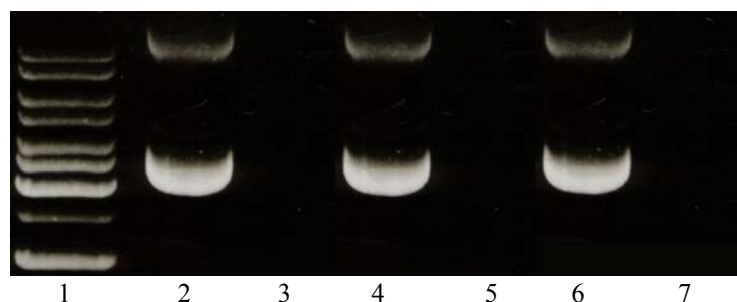


Рис. 4. Электрофорограмма плазмидной ДНК *pHisNucSma*: 1 – маркер нуклеиновых кислот фирмы *Fermentas 1 kb DNA Ladder*; 2 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmaHis89Ala*, выросшего в селективных условиях и не подвергнутого действию *EtBr*; 3 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmaHis89Ala*, выросшего под действием *EtBr* в отсутствие селектирующего фактора; 4 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmaArg57Ala*, выросшего в селективных условиях и не подвергнутого действию *EtBr*; 5 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmaArg57Ala*, выросшего под действием *EtBr* в отсутствие селектирующего фактора; 6 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmawt*, выросшего в селективных условиях и не подвергнутого действию *EtBr*; 7 – плазмидная ДНК штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmawt*, выросшего под действием *EtBr* в отсутствие селектирующего фактора

2.3. Определение активности неспецифических нуклеаз с помощью индикаторного агара. Определение активности неспецифических нуклеаз при базальном уровне экспрессии генов проводилось при использовании индикаторной среды, содержащей краситель толуидиновый голубой и полимерную ДНК [15]. В зависимости от уровня активности нуклеазы площадь изменения окраски индикаторной среды, образующаяся вокруг точки нанесения пробы, будет различаться: чем больше площадь изменения окраски, тем выше активность фермента. В основе обесцвечивания среды лежит специфическая реакция толуидинового голубого на изменение pH, сопровождающее гидролиз ДНК нуклеазой.

Как видно из рис. 5, нуклеазная активность присутствует лишь в лизате клеток тех штаммов (*TGE900 pHisNucSmawt* и *TGE900 pHisNucSmaArg57Ala*), которые несут плазмиды с геном нуклеазы дикого типа (100%-ная активность нуклеазы) и с геном нуклеазы с 35%-ной активностью, о чем свидетельствует наличие розовой зоны вокруг места нанесения пробы. Причем размер зоны напрямую зависит от уровня активности нуклеазы: розовое пятно вокруг места нанесения лизата клеток, несущих плазмиды с геном эндонуклеазы дикого типа, значительно крупнее, чем у мутанта с частичной (35%) активностью нуклеазы (плазида *pHisNucSmaArg57Ala*). Отсутствие розовой зоны на месте нанесения лизата клеток *TGE900 pHisNucSmaHis89Ala* и *TGE900* говорит об отсутствии нуклеазной активности, что соответствует мутантной форме нуклеазы, имеющей нулевую активность данного фермента, и бесплазмидному штамму.

Активность нуклеаз в рекомбинантных штаммах *E. coli TGE900 pHisNucSmaArg57Ala* и *pHisNucSmawt* определяли по формуле (1). Нуклеазная активность, показанная перечисленными выше штаммами на индикаторной среде, составляет 100% для нуклеазы дикого типа и 36% для мутанта *Arg57Ala*, что соответствует литературным данным [10, 28].

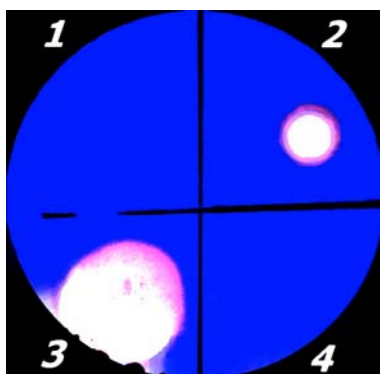


Рис. 5. Базальный уровень экспрессии генов мутантных эндонуклеаз на индикаторной среде: 1 – *TGE900 pHisNucSmaHis89Ala*; 2 – *TGE900 pHisNucSmaArg57Ala*; 3 – *TGE900 pHisNucSmawt*; 4 – *TGE900*

2.4. Определение уровня резистентности к антибиотику и активности β -лактамазы в рекомбинантных штаммах *E. coli*. Известно, что устойчивость бактериальных клеток к ампициллину (пенициллину) обусловлена β -лактамазами (пенициллиназами), расщепляющими β -лактамное кольцо антибиотика. Ген *bla*, детерминирующий синтез β -лактамазы, входит в состав хромосом, некоторых транспозонов и плазмид [29].

В ряде работ было показано, что существует связь между дозой гена, обуславливающей устойчивость к ампициллину и его экспрессией, то есть обнаружена линейная зависимость между устойчивостью к ампициллину и синтезом фермента и между синтезом фермента и копийностью гена *bla* [30]. Показано также, что увеличение числа копий плазмид сопровождается повышением уровня резистентности к ампициллину [31]. Таким образом, изменение уровня устойчивости к антибиотику и активности β -лактамазы может служить косвенным доказательством изменения количества ее генов. Для проверки вышесказанного проводилось определение активности β -лактамазы и уровня резистентности к ампициллину для рекомбинантных штаммов *E. coli TGE900*, несущих плазмиды *pHisNucSma*. Результаты экспериментов приведены в табл. 3.

Для того чтобы выяснить, коррелирует ли изменение уровня резистентности к антибиотику с изменением активности β -лактамазы, проводили измерение активности фермента йодометрическим методом, основанном на способности продуктов гидролиза β -лактамных антибиотиков восстанавливать йод до йодида, вызывая обесцвечивание йодокрахмального комплекса [32]. β -лактамазная активность выражается в условных единицах активности и рассчитывается по формуле (2). За единицу активности принимается наименьшее количество пенициллиназы (β -лактамазы), способной инактивировать 10^{-7} М бензилпенициллина или 59.3 ед. пенициллина за 1 ч при 37 °С в фосфатном буфере, pH 6.8–7.0, при наличии в растворе достаточного количества пенициллина [17]. В качестве референс-плазмиды с известным числом копий была взята плазида *pAP42 : Tn1*.

Табл. 3

Зависимость между устойчивостью клеток к ампициллину, активностью β -лактамазы и копийностью плазмид *pHisNucSma* в рекомбинантных штаммах *E. coli TGE900*

Плазмида	Уровень резистентности к ампициллину, мкг/мл	Активность β -лактамазы (в условных ед., $2 \cdot 10^5$ кл)	Количество копий плазмиды
<i>pAP42 : TnI</i>	500	114.8	1–2
<i>pHisNucSmaHis89Ala</i>	1000	350.365	3–4
<i>pHisNucSmaArg57Ala</i>	13000	4191.74	40
<i>pHisNucSmawt</i>	> 15000	10842.49	100

Как видно из табл. 3, клетки *E. coli*, несущие плазмиду *pAP42 : TnI*, растут на среде с ампициллином в концентрации не более 500 мкг/мл, штамм *E. coli TGE900 pHisNucSmaHis89Ala* устойчив к концентрации антибиотика 1000 мкг/мл, штамм *E. coli TGE900 pHisNucSmaArg57Ala* – к концентрации 13000 мкг/мл, и наиболее резистентный к ампициллину штамм *E. coli TGE900 pHisNucSmawt* – к концентрации, большей 15000 мкг/мл. У референс-плазмиды число копий составляет 1–2 на клетку, что соответствует наименьшей активности β -лактамазы (114.8 ед.). У штамма, несущего плазмиду *pHisNucSmaHis89Ala*, уровень β -лактамазной активности составил 350.365 ед., что соответствует 3–4 копиям плазмиды (из расчета около 100 ед. активности на 1 копию). У штамма *E. coli TGE900 pHisNucSmaArg57Ala* активность β -лактамазы составила 4191.74 ед., что соответствует приблизительно 40 копиям. Активность β -лактамазы у клеток, несущих плазмиду *pHisNucSmawt*, составляет 10842.49 ед., то есть эти клетки несут около 100 копий плазмиды.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что существует прямая зависимость уровня устойчивости клеток к ампициллину от количества копий плазмиды, несущей ген *bla*, в клетке: антибиотикорезистентность тем выше, чем больше копийность плазмиды. Наблюдается также увеличение копийности плазмиды с увеличением активности нуклеазы, ген которой экспрессируется на базальном уровне: копийность у плазмид с геном эндонуклеазы дикого типа выше, чем у плазмид, несущих ген неактивной нуклеазы. Как уже было отмечено ранее, эндонуклеаза *S. marcescens* в первую очередь расщепляет GC-богатые районы, образующие А-конформацию ДНК, характерную для ДНК-РНК-гибридов, а последовательности, обогащенные АТ-парами, разрушаются с гораздо меньшей скоростью [8]. Возможно, нуклеаза *S. marcescens* инициирует репликацию как плазмиды, так и хромосомы, заменяя действие РНКазы Н, разрезающей РНК в ДНК/РНК-гибриде в точке начала репликации с образованием 3'-конца, который используется в качестве затравки для синтеза ДНК.

В заключение можно сделать вывод, что базальный уровень экспрессии гена эндонуклеазы с большей активностью фермента приводит к увеличению уровня устойчивости к ампициллину, активности β -лактамазы, количества плазмидных копий. При этом наблюдается более стабильное наследование плазмид, несущих ген нуклеазы дикого типа, чем у мутантных аналогов.

Summary

O.A. Gimadutdinow, E.V. Kriakounova, R.G. Khamidullina, B.I. Barabanschikov. Influence of the Basal Level of *Serratia marcescens* Endonuclease Expression on Stability and Copy Number of pHisNucSma Plasmids in Recombinant *Escherichia coli* Strains.

The present work determines the activities of mutant *Serratia marcescens* nucleases by basal expression level of their genes situated in the *pHisNucSma* plasmid. Invert correlation between elimination of *pHisNucSma* plasmids and activity of the *S. marcescens* nuclease was established at the basal level of their genes' expression. It was shown that the higher an activity level of the mutant *S. marcescens* nuclease, the higher ampicillin resistance. The correlation between ampicillin resistance level, β -lactamase activity, and plasmid copies amount in recombinant *E. coli* strains was also revealed.

Key words: endonuclease, β -lactamase, plasmid, plasmid elimination, plasmid copy number.

Литература

1. Gribskov M., Burgess R.R. Overexpression and purification of the sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase // Gene. – 1983. – V. 26, No 2. – P. 109–118.
2. Goldwin D., Stater J.N. The influence of the growth on the stability of a drug resistance plasmid in *Escherichia coli* K-12 // J. Gen. Microbiol. – 1979. – V. 111. – P. 201–209.
3. Biederman K., Jepsen P.K., Riise E. et al. Purification and characterization of a *Serratia marcescens* nuclease activity // Carlsberg Rec. Commun. – 1989. – V. 54. – P. 17–21.
4. Friedhoff P., Gimadutdinow O., Ruter T., Wende W., Urbanke C., Thole H., Pingoud A. A procedure for renaturation and purification of the extracellular *Serratia marcescens* nuclease from genetically engineered *Escherichia coli* // Protein Expr. Purif. – 1994. – V. 5, No 1. – P. 37–43.
5. Jepsen P.K., Riise E., Biedermann K., Kristensen P.Ch.R., Emborg C. Two-level factorial screening for influence of temperature, pH and aeration on production of *Serratia marcescens* nuclease // Appl. Environ. Microbiol. – 1987. – V. 53, No 10. – P. 2593–2596.
6. Ruiz-Carillo A., Côté J. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G // Science. – 1993. – V. 261. – P. 765–769.
7. Dake E., Hoffman T. Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* // Biol. Chem. – 1988. – V. 263. – P. 7691–7702.
8. Meiss G., Friedhoff P., Hahn M., Gimadutdinow O., Pingoud A. Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease // Biochemistry. – 1995. – V. 34, No 37. – P. 11979–11988.
9. Gyi J.I., Conn G.L., Lane A.N., Brown T. Comparison of the thermodynamic stabilities and solution conformations of DNA-RNA hybrids containing purine-rich and pyrimidine-rich strands with DNA and RNA duplexes // Biochemistry. – 1996. – V. 35, No 38. – P. 12538–12548.
10. Friedhoff P., Gimadutdinow O., Pingoud A. Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis // Nucl. Acids Res. – 1994. – V. 22, No 16. – P. 3280–3287.
11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. – 560 p.
12. Westermeier R. Elektrophorese Praktikum. – Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 1990. – 98 S.

13. Chung C.T., Niemala S.L., Miller R.H. One step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution // Proc. Natl. Acad. Scie. USA. – 1989. – V. 86, No 7. – P. 2172–2175.
14. Van Die I.M., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M. Transformation in *Escherichia coli*: studies on the role of the heat shock in induction of competence // J. Gen. Microbiol. – 1983. – V. 129, No 3. – P. 663–670.
15. Meiss G., Gimadutdinov O., Friedhoff P., Pingoud A. Microtiter-plate assay and related assays for nonspecific endonucleases. Review. No abstract available // Methods Mol. Biol. – 2001. – V. 160. – P. 37–48.
16. Barth P.T., Richards H., Datta N. Copy number of coexisting plasmids in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. – 1978. – V. 135, No 3. – P. 760–765.
17. Perret C.J. Iodometric assay of penicillinase // Nature (London). – 1954. – V. 174, No 4439. – P. 1012–1013.
18. Щелкунов С.Н. Клонирование генов. – Новосибирск: Наука, 1986. – 232 с.
19. Льюин Б. Гены / Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 544 с.
20. Yanagida N., Uozumi T., Berru T. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the membrane of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1986. – V. 166, No 3. – P. 937–944.
21. Van Die I.M., Oosterhout A., Bergmans H.E.N., Hoekstra W.P.M. The influence of phase transition of membrane lipids on uptake of plasmid DNA in *Escherichia coli* transformation // FEMS Microbiol. Lett. – 1983. – V. 18. – P. 127–130.
22. Bergmans H.E., van Die I.M., Hoekstra W.P. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process // J. Bacteriol. – 1981. – V. 146, No 2. – P. 564–570.
23. Garcia E., Lopez P., Perez Urena M.T., Espinosa M. Association between DNA and surface structures in the *B. subtilis* transformation system // Proc. 4th Eur. Meet. Bacter. Transform and Transfect. – Oxford, 1979. – P. 103–111.
24. Dubnau D. Genetic transformation in *Bacillus subtilis* // Molecular Biology of the Bacilli. V. 1. *Bacillus subtilis* / Ed. D. Dubnau. – N. Y.: Academic Press, 1982. – P. 147–178.
25. Te Riele H.P.J., Venema G. Molecular fate of heterologous bacterial DNA in competent *Bacillus subtilis*: Further characterization of unstable association between donor and recipient DNA and the involvement of the cellular membrane // Mol. Gen. Genet. – 1984. – V. 195, No 1–2. – P. 200–208.
26. Tomas M., Kay W. A simple and rapid method for the elimination of R plasmids from enteric bacteria // Current Microb. – 1984. – V. 11, No 3. – P. 155–158.
27. Fuller W., Waring M.J. A molecular model for the interaction of ethidium bromide with deoxyribonucleic acid // Ber. Bunsen Ges. Phys. Chem. – 1964. – V. 68. – P. 805–808.
28. Friedhoff P., Kolmes B., Gimadutdinov O., Wende W., Krause K.L., Pingoud A. Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis // Nucl. Acids Res. – 1996. – V. 24, No 14. – P. 2632–2639.
29. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 381 с.
30. Uhlin B., Nordström K. R plasmid gene dosage effects in *Escherichia coli* K-12: Copy mutants of the R plasmid R1drd-19 // Plasmid. – 1977. – V. 1, No 1. – P. 1–7.
31. Ely S., Staudenbauer W.L. Regulation of plasmid DNA synthesis: Isolation and characterization of copy number mutant of mini R6-5 and miniF plasmids // Mol. Gen. Genet. – 1981. – V. 181, No 1. – P. 29–35.

32. *Livermore D.M.* Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics // *Scand. J. Infect. Dis.* – 1991. – V. 78, Suppl. – P. 7–16.

Поступила в редакцию
12.11.07

Гимадутдинов Олег Александрович – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского государственного университета.

E-mail: *Oleg.Gimadutdinov@ksu.ru*

Крякунова Елена Вячеславовна – аспирант кафедры генетики Казанского государственного университета.

Хамидуллина Раиса Гусмановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики Казанского государственного университета.

Барабанщиков Борис Иванович – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики Казанского государственного университета.