

УДК 573.663

РЕФЕРЕНС-ПЛАЗМИДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОПИЙНОСТИ ПЛАЗМИД, СОДЕРЖАЩИХ *VLA*-ГЕН

Е.В. Крякунова, Р.Г. Хамидуллина, Б.И. Барабанищikov,
О.А. Гиладутдинов

Аннотация

В настоящей работе было проведено клонирование гена β -лактамазы в плазмиду *pETcocoSt*, обладающую способностью изменять свою копиюность в зависимости от состава питательной среды. Был определен уровень устойчивости к ампициллину в рекомбинантном штамме *E. coli DH5 α pETcocoStAmp* в зависимости от углеводного субстрата. Выявлена корреляция между уровнем устойчивости к ампициллину, количеством β -лактамазы и копиюностью плазмиды *pETcocoStAmp* в рекомбинантном штамме *E. coli DH5 α* в зависимости от углеводного субстрата.

Ключевые слова: контроль экспрессии, плаزمида, копиюность плазмиды, β -лактамаза, регуляция репликации.

Введение

В последнее время одним из направлений генной инженерии является создание векторов для экспрессии генов, кодирующих биополимеры, которые могут быть токсичными для клеток-хозяев. Такие векторы должны обладать способностью как регулировать экспрессию клонированных генов, так и изменять свою копиюность в зависимости от состава питательной среды [1].

В настоящий момент широко используются плазмидные векторы, копиюность которых регулируется за счет присутствия или отсутствия углеводных субстратов, в частности глюкозы и арабинозы. *pETcocoSt* – векторная система с уникальной регуляцией копиюности плазмиды от одной до 40 копий на клетку в зависимости от содержания в среде углеводного субстрата [2].

Так, при наличии в питательной среде глюкозы в клетке содержится 1 копия плазмиды, репликация которой инициируется с участка *oriS* и контролируется конститутивными генами *repE*, *parA*, *parB*, *parC* и *araC*. Продукт гена *araC*, белок-репрессор *AraC*, блокирует репликацию плазмиды с участка *oriV*.

Увеличение числа копий плазмиды осуществляется с помощью индуктора – арабинозы, которая инактивирует белок-репрессор *AraC*, что, в свою очередь, ведет к снятию блока репликации с участка *oriV* и экспрессии гена-репликатора *trfA*. Основные преимущества двойного контроля экспрессии генов плазмиды заключаются в том, что в неиндуцированном состоянии экспрессия генов очень низка, именно это позволяет сохранять гены, кодирующие токсичные продукты в клетках хозяина. Одна из причин эффективной работы данного контроля связана

с копийностью плазмид, поскольку количество синтезируемого клеткой продукта часто зависит от дозы его гена [3].

Если бы плазида *pETcocoCm* содержала ген β -лактамазы (*bla*), для которого существует прямая корреляция между дозой гена и количеством синтезируемого фермента [4], то такая плазида могла бы использоваться в качестве референс-плазмиды для косвенного определения копийности других плазмид.

Целью настоящей работы явилось создание вектора, который можно было бы использовать в качестве референс-плазмиды для косвенного определения копийности плазмид, содержащих *bla*-ген.

1. Материалы и методы

1.1. Объекты исследования. Были использованы штаммы *Escherichia coli* *DH5 α* и *LK111 λ* и плазмиды: *pBluescriptSK* (рис. 1, а), *pETcocoCm* (рис. 1, б).

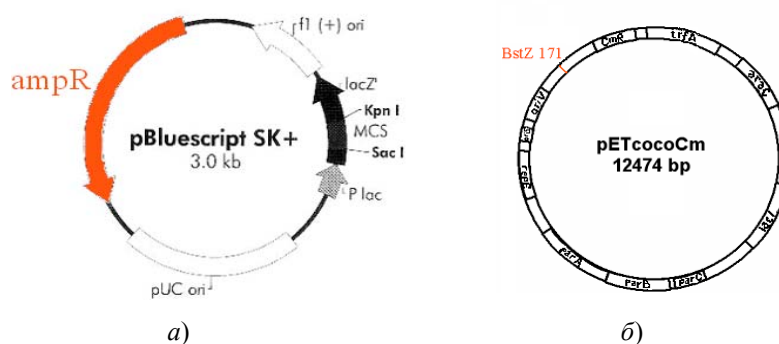


Рис. 1. Конструкция плазмид: а) *pBluescriptSK*, б) *pETcocoCm*

1.2. Питательные среды: LB-бульон (*Luria-Bertani*) и LB-агар [5]. Для создания селективных условий при культивировании рекомбинантных штаммов в LB-среду вносили ампициллин в концентрации 50 мкг/мл.

1.3. Получение компетентных клеток. Компетентные клетки бесплазмидного штамма *E. coli* *DH5 α* получали по методике Чанга и др. [6].

1.4. Трансформация клеток heat shock методом. Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* бесплазмидного штамма *DH5 α* и плазмиду *pETcocoAmpCm* [7].

1.5. Выделение плазмидной ДНК. В LB-бульон, содержащий ампициллин (50 мкг/мл) и глюкозу в следующей концентрации: 0.2% (проба 1); 0.5% (проба 2); 0.2% (проба 3), вносили культуру клеток *Escherichia coli* *DH5 α* с плазмидой *pETcocoAmp* и инкубировали при 37 °С в течение ночи. Оптическую плотность всех образцов доводили до $A_{590} = 0.05$, затем в пробы добавляли глюкозу в следующей концентрации: 0.2% (проба 1); 0.5% (проба 2) и не добавляли (проба 3).

Инкубировали при 37 °С на качалке до $A_{590} = 0.3-0.4$, после чего в пробу 3 вносили 0.01%-ную арабинозу и все три пробы инкубировали еще 4 ч на качалке при 37 °С. Оптическую плотность всех образцов доводили до одинакового значения ($A_{590} = 1$). Выделение плазмидной ДНК проводили по стандартной методике [5].

1.6. Электрофорез в агарозном геле. Для проведения электрофореза использовалась 1%-ная агароза в трис-боратном буфере, рН 8.0 [8].

1.7. Определение уровня резистентности к антибиотику. В чашки Петри заливали LB-агар с градиентом антибиотика ампициллина [9]. Кроме того, для контроля над копийностью вектора *pETCocoStAmp* добавляли 0.01%-ную L-арабинозу или 0.2%-ную и 0.5%-ную D-глюкозу. Засевали на следующий день петлей с культурой клеток по направлению к максимальной концентрации антибиотика. Инкубировали в течение ночи при 28 °С.

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 (± 50 мкг/мл от точки прекращения роста на чашках). За уровень резистентности принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой не происходило видимого роста через 18–20 ч инкубирования при 28 °С.

1.8. Определение активности β -лактамазы. Культуру клеток выращивали в LB-бульоне в течение 18 ч при 37 °С. В качестве контроля были взяты клетки бесплазмидного штамма *DH5 α* . Клетки осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 2 мин. Осадок ресуспендировали в 5 мл буфера TES следующего состава: 0.1 М NaCl; 10 мМ трис-НСl; 1 мМ ЭДТА; рН 7.8 и довели оптическую плотность образцов на ФЭК до величины $A_{530} = 0.18$. Отбирали 5 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 Перрет [10].

β -лактамазную активность рассчитывали по формуле:

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

где x – условные единицы активности ВНИИА; V_1 – количество мл 0.01 н. раствора гипосульфита натрия, использованного для титрования в контрольном опыте; V_2 – количество мл 0.01 н. раствора гипосульфита натрия, использованного для титрования исследуемого раствора; k – поправка 0.01 н. раствора гипосульфита натрия (1); T – теоретическая активность натриевой (1667 ед./мл) или калиевой (1600 ед./мл) солей бензилпенициллина; F – количество мл 0.01 н. раствора йода, поглощаемого 1 мг бензилпенициллина (для натриевой соли – 2.26, для калиевой соли – 2.15); 2 (мл) – объем испытуемого раствора; d – сте-

пень разведения основного раствора, содержащего β -лактамазу; 1 (мл) – объем раствора, взятого для определения активности; 60 (ед.) – количество пенициллина, инактивируемого 1 ед. пенициллиназы за 60 мин при 37 °С.

2. Результаты и их обсуждение

Как уже было сказано выше, двойной контроль экспрессии генов вектора *pETcocoCm* основан на двух альтернативных точках начала репликации *oriS* и *oriV* [3]. Этот вектор также характеризуется наличием в его составе очень сильного P_{lac} -промотора, контроль которого осуществляется с помощью арабинозы [2]. Кроме того, в состав этой плазмиды входят ген репликатора *repE* и гены *parAB*, действующие в *oriS*. В плазмиде также находятся ген *parC* (обеспечивает низкокопийность) и ген репликатора *trfA*, белки которого прикрепляются к повторяющимся последовательностям в 17 п.о. с 5'-конца точки *oriV*. Такое прикрепление ведет к образованию открытого комплекса, который стабилизируется белками *DnaA* или *HU*. *OriS* является конститутивной точкой начала репликации, действующей в отсутствие условий для индукции репликации. В отличие от нее, точка *oriV* представляет собой факультативную точку начала репликации, которую можно контролировать с помощью находящихся в среде углеводных субстратов [11].

При наличии в питательной среде глюкозы белок *RepE* активирует точку *oriS*, запуская процесс репликации, который продолжается до тех пор, пока глюкоза не закончится. При низком содержании глюкозы в среде (от 0.2% до 0.5%) белок *RepE* связывается с локусом *copA/incC*, что приводит к слиянию *oriS* с локусом *copA/incC*, при этом происходит ингибирование процесса репликации. Так как глюкоза легко усваивается клеткой, то при ее содержании в среде клетке не требуется увеличения активности продуктов плазмидных генов и, следовательно, увеличения числа плазмидных копий [12].

Регуляция копийности плазмиды *pETcocoCm* при наличии в питательной среде арабинозы происходит по типу *AraC+pBAD*. Пока в среде содержится лишь глюкоза, P_{lac} -промотор, который объединен с сайтом связывания регулятора *AraC*, находится в неактивном состоянии. В таких условиях один мономер *AraC* присоединяется к сайту *araI1*, другой – к половине сайта *araO2* (рис. 2, а). Поскольку эти два сайта располагаются на расстоянии 194 п.о. друг от друга, то при присоединении *AraC* между ними формируется петля. Кроме того, не происходит связывания мономера *AraC* с половиной сайта *araI2* – посредника активации экспрессии *araBAD*-оперона [2], таким образом система экспрессии не запускается.

При появлении в среде арабинозы и в отсутствие глюкозы происходит индукция P_{lac} -промотора и, соответственно, переход от низкокопийности к высококопийности, поскольку арабиноза стимулирует активирующий *oriV* ген *trfA*. При этом копийность вектора увеличивается до 40–50 копий на клетку [11]. Тогда же белок-активатор *AraC* связывается с арабинозой и приобретает такую конформацию, которая позволяет ему частично связаться с ДНК в области сайтов *araI1* и *araI2* (рис. 2, б). Уровень экспрессии генов *araBAD*-оперона в присутствии в среде арабинозы является довольно высоким (в 10000 раз выше нормы) [2], что служит основой для создания различных векторов.

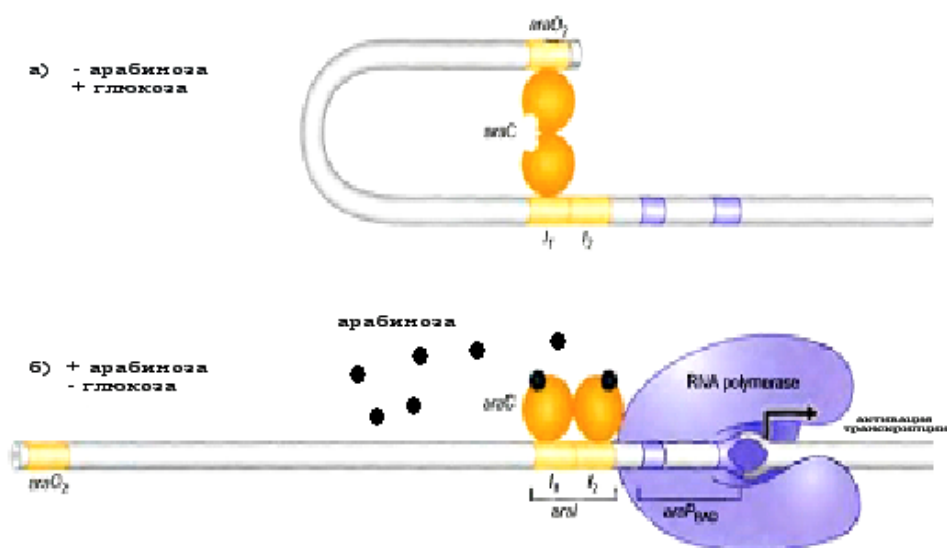


Рис. 2. Регуляция экспрессии генов *araBAD*-оперона посредством изменения углеводного состава среды: а) в присутствии глюкозы и в отсутствие арабинозы; б) в отсутствие глюкозы и в присутствии арабинозы

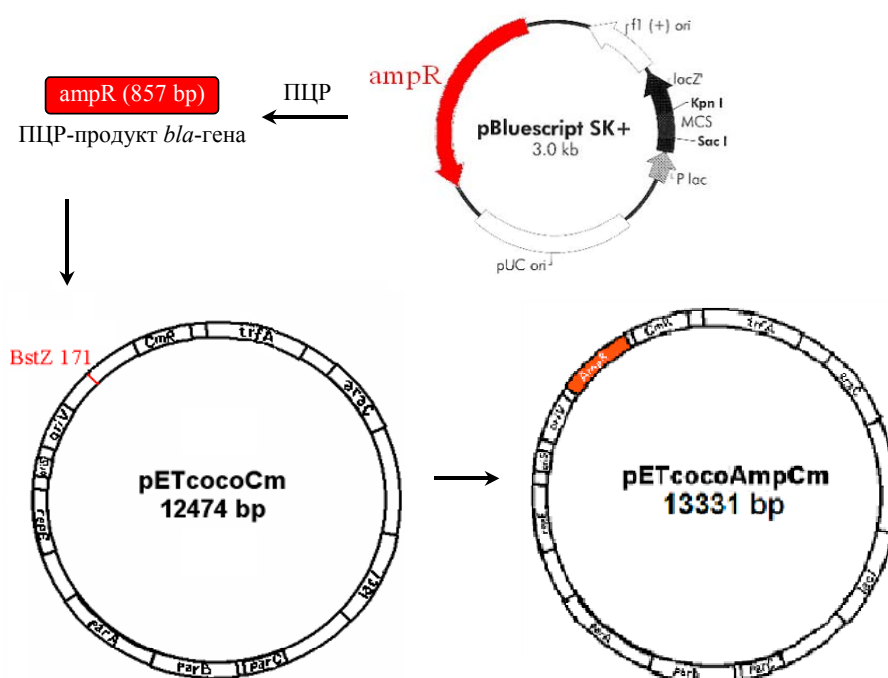


Рис. 3. Схема получения плазмиды *pETcocoAmpCm*

2.1. Клонирование *bla*-гена. Для получения референс-плазмиды *pETcocoCmAmp* мы провели клонирование с помощью ПЦП *bla*-гена из плазмиды *pBluescriptSK* в плазмиду *pETcocoCm* по сайту *Bstz 171* с помощью праймеров (на 5'-gta gta tac gcg cgg aac ccc tat ttg и на 3'-gta gta tac gta aac ttg gtc tga sag), имеющих на концах сайты рестрикции *BstZ171* (рис. 3).

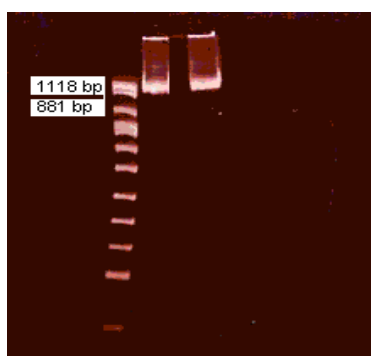


Рис. 4. ПЦР-продукты скрининга трансформированных клеток, несущих плазмиду *pETcocoCmAmp* с геном *bla* (6% ПААГ в ТПЕ-буфере). Маркер нуклеиновых кислот фирмы Fermentas pUC8 Mix

Полученные с помощью ПЦР фрагменты *bla*-гена очищались с помощью набора *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System*. Плазмида *pETcocoCm* разрезалась по сайту рестрикции *Bstz 171*, в результате чего она приобретала линейную структуру. После этого очищенные фрагменты *bla*-гена лигировались с находящейся в линейном состоянии плазмидой *pETcocoCm* по сайтам *Bstz 171*. В результате был получен вектор *pETcocoAmpCm*.

Полученную плазмиду *pETcocoAmpCm* трансформировали в клетки *E. coli* штамма *LK1111* и высевали на селективную среду, содержащую ампициллин. Далее проводился скрининг на наличие *bla*-гена с помощью ПЦР-реакции клонов, обладающих устойчивостью к ампициллину (рис. 4). Из отобранных резистентных к ампициллину клонов выделяли плазмиду *pETcocoAmpCm* и трансформировали ее в клетки *E. coli* штамма *DH5 α* и высевали на селективную среду, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл и 0.2%-ную глюкозу.

2.2. Определение уровня устойчивости к ампициллину в рекомбинантном штамме *E. coli DH5 α pETcocoCmAmp* в зависимости от углеводного субстрата. Известно, что существует прямая корреляция между дозой (количеством копий) *bla*-гена, обуславливающего устойчивость к ампициллину, и его экспрессией, то есть обнаружена линейная зависимость между устойчивостью к ампициллину и синтезом фермента и между синтезом фермента и копийностью *bla*-гена [4]. Показано также, что увеличение числа копий плазмид сопровождается повышением уровня резистентности к ампициллину [14]. Таким образом, изменение уровня устойчивости к антибиотику и активности β -лактамазы может служить косвенным доказательством изменения количества ее генов. Для подтверждения вышесказанного определяли уровень устойчивости к ампициллину в зависимости от углеводного субстрата в полученном нами рекомбинантном штамме *E. coli DH5 α pETcocoCmAmp*. Так, при выращивании рекомбинантного штамма на среде с 0.2%-ной глюкозой, уровень устойчивости составил 50 мкг/мл, при выращивании на среде с 0.5%-ной глюкозой уровень устойчивости был равен приблизительно 100 мкг/мл. При выращивании клеток *E. coli DH5 α pETcocoCmAmp* на среде с арабинозой в концентрации 0.01% уровень устойчивости к ампициллину рекомбинантного штамма увеличивался до 3500 мкг/мл, что косвенно указывает на увеличение количества копий *bla*-гена.

Табл. 1

Зависимость между устойчивостью клеток к ампициллину, активностью β -лактамазы и копийностью плазмиды *pETcocoAmp* в рекомбинантном штамме *E. coli DH5a*

Углеводный субстрат	Уровень резистентности к ампициллину, мкг/мл	Количество β -лактамазы (в усл. ед. ВНИИА, $2 \cdot 10^5$ кл)	Количество копий <i>bla</i> -гена (плазмиды)
0.2%-ная D-глюкоза	50	7 ± 0.5	~1
0.5%-ная D-глюкоза	100	15 ± 1.2	~2
0.01%-ная L-арабиноза	3500	260 ± 7.4	~37

2.3. Определение количества фермента β -лактамазы и копийности плазмиды *pETcocoAmp* в рекомбинантном штамме *E. coli DH5a* в зависимости от углеводного субстрата. В ряде работ было показано, что активность β -лактамазы зависит от дозы гена *bla*, поэтому увеличение активности фермента зависит от увеличения копийности плазмиды [4]. Из вышесказанного следует: в присутствии L-арабинозы вырабатывается большее число копий плазмиды (до 35), что увеличивает дозу гена *bla* с соответствующим повышением активности β -лактамазы и уровня устойчивости к ампициллину. Определение количества фермента β -лактамазы проводилось методом йодометрического титрования, основанном на способности продуктов гидролиза β -лактамных антибиотиков восстанавливать йод до йодида, вызывая обесцвечивание йодокрахмального комплекса [15].

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что клетки *E. coli*, несущие плазмиду *pETcocoStAmp*, при 0.2%-ной D-глюкозе растут на среде с ампициллином в концентрации не более 50 мкг/мл и обладают наименьшей активностью β -лактамазы (7 ед.). По сравнению с ними клетки *E. coli*, выращенные на 0.5%-ной D-глюкозе, более устойчивы к ампициллину (примерно в 2 раза), и, соответственно, активность β -лактамазы у них выше примерно в 2 раза. При выращивании клеток *E. coli* с добавлением 0.01%-ной L-арабинозы уровень резистентности к ампициллину достигает 3500 мкг/мл, и, соответственно, количество β -лактамазы у них также увеличивается примерно в 37 раз и составляет 260 ед. Такое изменение количества β -лактамазы в зависимости от субстрата, по-видимому, можно объяснить изменением количества копий *bla*-гена.

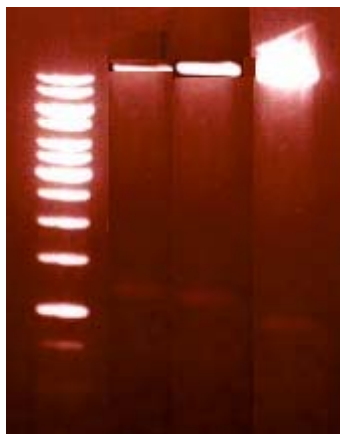
Для подтверждения увеличения копийности плазмиды в зависимости от углеводного субстрата было проведено выделение вектора *pETcocoStAmp* из одинакового количества клеток рекомбинантного штамма *E. coli DH5a pETcocoAmp*.

Как видно из табл. 2, клетки *E. coli*, несущие сконструированную нами плазмиду *pETcocoStAmp*, при выращивании на питательной среде с 0.2%-ной D-глюкозой содержали плазмидную ДНК в концентрации 10 нг/мкл. При выращивании с 0.5%-ной D-глюкозой количество выделенной ДНК составило 20 нг/мкл, а с 0.01%-ной L-арабинозой концентрация плазмидной ДНК увеличилась до 370 нг/мкл. Эти данные позволяют сделать вывод о том, что увеличение количества плазмидной ДНК связано с увеличением ее копийности, что подтверждается и электрофоретическим анализом плазмидной ДНК *pETcocoStAmp* (рис. 5).

Табл. 2

Концентрация плазмидной ДНК *pETcocoCmAmp*, выделенной из рекомбинантного штамма *E. coli DH5a* в зависимости от углеводного субстрата

Субстрат, %	0.2%-ная D-глюкоза, нг/мкл	0.5%-ная D-глюкоза, нг/мкл	0.01%-ная L-арабиноза, нг/мкл
Концентрация плазмидной ДНК, нг/мкл	10	20	370



1 2 3 4

Рис. 5. Электрофоррограмма плазмидной ДНК *pETcocoCmAmp*: 1 – маркер нуклеиновых кислот фирмы Fermentas 1 kb DNA Ladder; 2 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli DH5a pETcocoCmAmp*, выросшего на среде с 0.2%-ной глюкозой; 3 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli DH5a pETcocoCmAmp*, выросшего на среде с 0.5%-ной глюкозой; 4 – плазмидная ДНК рекомбинантного штамма *E. coli DH5a pETcocoCmAmp*, выросшего на среде с 0.01%-ной арабинозой

На основании полученных результатов можно заключить, что сконструированный нами вектор можно использовать в качестве референс-плазмиды для определения числа копий любых плазмид, содержащих ген *bla*.

Summary

E.V. Kryakunova, R.G. Khamidullina, B.I. Barabanshchikov, O.A. Gimadutdinow. Reference-plasmid for Determination of Copy Number of Plasmids Containing *bla*-gene.

The article presents the results of the cloning of β -lactamase gene in *pETcocoCm* plasmid possessing the ability to change its copy number depending on the nutrient medium composition. The level of resistance to ampicillin has been defined depending on a carbohydrate substratum in recombinant *E. coli DH5a pETcocoCmAmp* strain. Correlation has also been revealed between the level of ampicillin resistance, amount of β -lactamase and *pETcocoCmAmp* plasmid copy number depending on a carbohydrate substratum in recombinant *E. coli DH5a* strain.

Key words: expression control, plasmid, plasmid copy number, β -lactamase, regulation of replication.

Литература

1. Lee S.G., Liao J.C. Control of Acetate Production Rate in *Escherichia coli* by Regulating Expression of Single-Copy *pta* Using *lacIQ* in Multicopy Plasmid // J. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V. 18, No 2. – P. 334–337.
2. Friehs K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2004. – V. 86. – P. 47–82.
3. Novy R., Yaeger K., Held D., Mierendorf R. Coexpression of multiple target proteins in *E. coli* // inNovations. – 2002. – V. 15. – P. 2–6.
4. Uhlin B., Nordström K. R-plasmid gene dosage effects in *Escherichia coli* K-12, copy mutants of the R-plasmid RI drd-19 // Plasmid. – 1977. – V. 1. – P. 1–7.
5. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. – N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 555 p.
6. 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. – P. 2172–2175.
7. 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. – P. 663–670.
8. Westermeier R. Elektrophorese Praktikum. – VCH, Weinheim, 1990. – 98 S.
9. Barth P.T., Richards H., Datta N. Copy number of coexisting plasmids in *Escherichia coli* K-12 // J. Bacteriol. – 1978. – V. 135. – P. 760–765.
10. Perret C.J. Iodometric assay of penicillinase // Nature (London). – 1954. – V. 174. – P. 1012–1013.
11. Sektas M., Szybalski W. Novel single-copy pETcoco™ vector with dual controls for amplification and expression // inNovations. – 2002. – V. 14. – P. 6–8.
12. Nordström K., Dasgupta S. Copy-number control of the *Escherichia coli* chromosome: a plasmidologist's view // EMBO reports. – 2006. – V. 7. – P. 484–489.
13. Friehs K. Plasmid Copy Number and Plasmid Stability // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2004. – V. 86. – P. 47–82.
14. Ely S., Staudenbaner W.L. Regulation of plasmid DNA synthesis: isolation and characterization of copy number mutant of mini RG-5 and mini F plasmids // Mol. Gen. Genet. – 1981. – V. 181. – P. 29–35.
15. Livermore D.M. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics // Scand. J. Infect. Dis. – 1991. – V. 78. – P. 7–16.

Поступила в редакцию
22.12.09

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

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

E-mail: Oleg.Gimadudinov@ksu.ru