

УДК 557.21:579.834.114:616.98-07

И. А. Лавриненко, А. В. Рябченко, А. Б. Беклемишев

Научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН
ул. Акад. Тимакова, 2, Новосибирск, 630117, Россия
E-mail: ibch@soramn.ru

СОЗДАНИЕ ЦЕЛЬНОКЛЕТОЧНОЙ БИОСЕНСОРНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА КЛЕТКУ

Возрастающий уровень загрязнения окружающей среды генотоксическими соединениями приводит к необходимости разработки специфических и чувствительных методов детекции таких соединений в воде, почве, растениях, продуктах питания. В настоящем исследовании использован штамм *E. coli*, содержащий плазмиду *PRTGFPF2* с клонированным в нее геном зеленого флуоресцирующего белка (*gfp*) из медузы *Aequorea victoria*, находящегося под контролем слитого с этим геном промотора *recA*, который индуцируется соединениями, повреждающими ДНК клетки. Созданный на основе синтеза белка *gfp* биосенсор позволяет оценить действие ряда генотоксических соединений на ДНК живой клетки.

Ключевые слова: генотоксичность, биосенсор, зеленый флуоресцирующий белок.

Возрастающее загрязнение окружающей среды токсическими соединениями техногенной природы выдвигает в круг первоочередных задач экологии разработку чувствительных методов оценки генотоксического воздействия соединений, накапливающихся в воде, почве, растениях и продуктах питания.

В настоящее время в экологическом мониторинге используются различные методы анализа. Однако аналитические методы, применяемые для измерения уровня ксенобиотиков в окружающей среде (спектроскопические, нейтронно-активационный, электрохимические, газовая хроматография, хроматография высокого давления, ядерный магнитный резонанс, масс-спектрометрия), не пригодны для обычного использования. Ответ на вопрос об опасности экотоксикантов для организма человека и животных могут дать только биохимические и медицинские методы. В последние годы целью ряда исследований была разработка биосенсорных методов для оценки воздействия мутагенных и канцерогенных факторов окружающей среды на клетку, в частности, цельноклеточных биосенсорных тест-систем. Обычно цельноклеточные биосенсоры являются прокариотическими клетками и трансформированы плазмидами, которые имеют в своем составе промотор, отвечающий на воздействие экотоксиканта,

а также ген, транскрибируемый с этого промотора. Получены, например, биосенсоры, которые включали гены *SOS*-репаративного ответа на генотоксиканты. Среди промоторов таких генов применялись *recA*, *recN*, *umuC*, *sulA*, *uvrA*, *cda* [1–7]. В качестве репортерных генов, использованных в биосенсорных тест-системах, отметим ген β -галактозидазы (*lacZ*), который широко использовался при изучении мутагенного потенциала ксенобиотиков [4]. Недавно были получены биосенсоры для детекции генотоксинов на основе генов *lux* оперона (*luxCDABE*) из *Vibrio fishery*, *V. harveyi* и других морских бактерий, кодирующих бактериальную люциферазу и *luc* генов, кодирующих эукариотическую люциферазу [1; 3; 7]. В последние годы в качестве репортерных белков широко используют обладающие собственной флуоресценцией белки *GFP* и *DSRed*, не требующие для проведения анализа кофакторов, субстратов и дополнительных источников энергии [8–10]. Флуоресценция *GFP* стабильна и может быть исследована *in situ* без разрушения содержащих этот белок клеток.

В данной работе мы описали конструкцию биосенсора для детекции генотоксинов, повреждающих структуру ДНК. Данный биосенсор содержит промотор *recA* *Proteus mirabilis*, с которого транскрибируется ген флуоресцирующего зеленого белка

GFP, клонированный в плазмиду *pRTGF2*.

Материал и методы

Конструирование биосенсора. Репортерный штамм *E. coli* содержит плазмиду *pRTF2* с фрагментом мутантного гена *GFP Aequorea victoria*. В качестве источника гена *GFP Aequorea victoria* служила плазида *pGreenTIR* [10]. Ген амплифицировали полимеразной цепной реакцией. Для амплификации кодирующей области мутантного гена *GFP*, использовали праймеры 5'-ATGAATTCTATGAGTAAAGGAGAAGAАСТТ-3' и 5'-TTGGTGACSTTTGTATAGTTCA-TCCATGC-3'. На 5'-концах праймеров были синтезированы сайты узнавания рестриктазами *EcoRI* и *BstEII*, предназначенные для встройки ампликона. Ампликоны гидролизовали рестриктазами, очищали фенол-хлороформной экстракцией. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции и лигирование Т4 ДНК-лигазой проводили согласно инструкциям фирмы-изготовителя ферментов («СибЭнзим», Россия).

Полимеразная цепная реакция. Для проведения ПЦР использовали амплификатор МС-2 («ДНК-технология», Россия). Реакцию проводили в пластиковых пробирках объемом 0,5 мл. Состав реакционной смеси содержал 67 мМ Трис-НСl с рН 8,3, 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 мМ MgCl_2 ; *Pfu* ДНК-полимераза, 0,03 % (об/об) Твин-20, 0,2 мкМ каждого праймера, 100 мкМ каждого дНТФ, ~200 пМ плазмидной ДНК *pGreenTIR*. ПЦР проводили в следующих температурно-временных условиях каждого цикла реакции: первые 5 циклов – денатурация ДНК при 94 °С 30 с; отжиг праймеров с ДНК при 52 °С 30 с; синтез цепи ДНК при 72 °С 90 с; в последующих 30 циклах отжиг праймеров проводили при 62 °С.

Получение *BstEII-EcoRI* фрагмента ДНК плазмиды *pREB9-H6-F7*. Плазмидную ДНК исходной для конструирования плазмиды *pREB9-H6-F7*, которая ранее была создана в нашей лаборатории, гидролизовали рестриктазами *BstEII* и *EcoRI*. Линейную форму плазмидной ДНК размером 3449 п. о. (фрагмент *BstEII-EcoRI*) отделяли от продуктов гидролиза в 0,8 % агарозном геле. Необходимый фрагмент плазмидной ДНК вырезали из агарозного геля и растворяли в равном

объеме раствора, содержащего 8 М NaClO_4 и 2 мМ ЭДТА, рН 7,0. Раствор охлаждали до комнатной температуры и вносили в него «силику» (мелкодисперсный оксид кремния). Содержимое пробирки инкубировали в течение 15 мин. После сорбции ДНК силику осаждали центрифугированием в течение 15–20 с при 10 000 г. Осадок силики с сорбированной ДНК дважды промывали раствором, содержащим 4 М NaClO_4 и 1 мМ ЭДТА, рН 7,0. Для освобождения осадка силики от NaClO_4 осадок дважды промывали 70 % этанолом, затем обезвоживали 96 % этанолом и высушивали. Сорбированную на силике ДНК элюировали 50 мкл бидистиллированной воды, инкубируя суспензию в термостате в течение 10 мин при 50 °С. После осаждения силики центрифугированием при 10 000 г в течение 2 мин в растворе оказывалось около 70 % исходной ДНК, не содержащей примесей в виде моно- или олигонуклеотидов.

Получение плазмиды *pRTF2*. Очищенный фрагмент плазмидной ДНК *pREB9-H6-F7* (*BstEII-EcoRI*) лигировали с предварительно гидролизованным мутантным геном *GFP*. Лигирование проводили с помощью Т4 ДНК-лигазы. На завершающем этапе лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* шт. *BL21 (DE3)* (ГНЦ вирусологии и биотехнологии, НИИ «Коллекция культур микроорганизмов», Кольцово, Россия).

Трансформацию клеток *E. coli* рекомбинантной плазмидной ДНК проводили с помощью электропоратора («ReqLab, Biotechnologie GmbH»). После электропорации трансформированные клетки быстро переносили в 2 мл среды Луриа–Бертани (ЛБ), не содержащей антибиотика, и инкубировали в течение 1 час при 37 °С. Подросшие трансформированные клетки концентрировали центрифугированием при 10 000 г в течение 1 мин на настольной центрифуге и рассеивали на агаризованной среде ЛБ с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл. Чашки инкубировали при 37 °С до образования колоний диаметром 0,5–1 мм.

Часть выросших клонов клеток *E. coli* была проанализирована с помощью ПЦР с праймерами *PR149F2* и *PR150* на наличие в составе рекомбинантной плазмиды *pRTF2* мутантного гена *GFP*. Клоны, давшие положительный ответ, исследованы на спо-

способность синтезировать белок *GFP* под действием индуктора экспрессии – налидиксовой кислоты. Один из клонов, давших положительный результат во всех анализах, использовался далее для оценки мутагенного воздействия различных веществ.

Детекция экспрессии гена белка *GFP* в клетках *E. coli*. Для детекции использовали культуры клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантной плазмидой *pRTF2*. Детекцию флюоресценции синтезируемого белка *GFP* осуществляли с помощью флюориметра F-3 000 («Hitachi», Япония).

Подготовка культур. Клетки *E. coli* штамма *BL21 (DE3)*, трансформированные плазмидой *pRTF2*, выращивали в течение ночи при 37 °С в среде ЛБ с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл. Пересев ночной культуры *E. coli* проводили на свежую среду ЛБ с добавлением ампициллина до 100 мкг/мл в отношении 1 : 50 (к 50 мл среды добавляли 1 мл культуры). Культуру выращивали в течение 4–5 часов до плотности 0,6–0,7 ($\lambda = 600$ нм).

Индукция синтеза белка. После достижения указанной плотности к среде ЛБ добавляли мутагены. Синтез белка *GFP* оценивали при длине волны возбуждения флюоресценции 480 нм и длине волны эмиссии 520 нм. В качестве отрицательного контроля были взяты параллельные культуры клеток *E. coli*, в которые мутагены не добавляли. В качестве мутагенов использовали налидиксовую кислоту, митомицин С, перекись водорода, формальдегид. Налидиксовая кислота и митомицин С являются стандартными веществами для индукции мутаций в геноме клеток *E. coli*. Налидиксовая кислота воздействует на ДНК-гиразу и создает протяженные неспаренные участки в ДНК. Митомицин С вызывает сшивки двойной цепи ДНК. Перекись водорода окисляет нуклеотиды ДНК, формальдегид вызывает образование сшивок ДНК.

Интенсивность флюоресценции нормировали на оптическую плотность клеток, равную 1,0 при 600 нм. Интенсивность флюоресценции оценивали с помощью фактора индукции (усл. или отн. ед.). Фактор индукции (F инд) определялся как отношение интенсивности флюоресценции в опыте (нормированной по плотности клеток культуры в опыте) к интенсивности флюорес-

ценции в контроле (нормированной по плотности клеток культуры в контроле):

$$F \text{ инд.} = (F1 \text{ оп.} \times D \text{ к.}) / (F1 \text{ к.} \times D \text{ оп.}),$$

где F1 оп. – интенсивность флюоресценции в опыте; F1 к. – интенсивность флюоресценции в контроле; D оп. – плотность клеток в опыте; D к. – плотность клеток в контроле.

Результаты исследования и обсуждение

Известно, что при существенных повреждениях ДНК индуцируются гены *SOS*-репарации этих повреждений. При этом активируется *recA* промотор и синтезируется *RecA* белок, который инициирует саморасщепление *LexA* репрессора, подавляющего в обычных условиях гены *SOS*-репарации. При этом *RecA* играет ключевую роль в нескольких путях репарации поврежденных ДНК [11]. Таким образом, создание генетической конструкции с использованием *recA* промотора, слитого с репортерным геном, позволяет создать чувствительный биосенсор на повреждение ДНК.

В настоящем исследовании мы сконструировали репортерную линию *E. coli*, содержащую зеленый флуоресцирующий белок (*GFP*). Репортерная линия была проверена на способность детектировать сублетальные концентрации известных мутагенов: налидиксовой кислоты, митомицина С, формальдегида и перекиси водорода (рис. 1–4).

Плазмида *pRTF2* не уступает лучшей из двух плазмид в созданной в работе [11] по чувствительности к перекиси водорода и формальдегиду, а по чувствительности к налидиксовой кислоте и митомицину С значительно ее превосходит (при использовании плазмиды *pRTF2* значение F инд = 65 для концентрации налидиксовой кислоты, равной 4 мкМ; в работе [11] значение F инд для указанной концентрации налидиксовой кислоты равно 2. При использовании плазмиды *pRTF2* значение F инд = 35 для концентрации митомицина С, равной 12 нМ, в работе [11] значение F инд для указанной концентрации митомицина С равно 2. При этом регистрировался дозозависимый ответ на различные концентрации генотоксинов. Отметим, что наиболее существенный ответ наблюдался при изучении влияния на синтез зеленого флуоресцирующего белка при

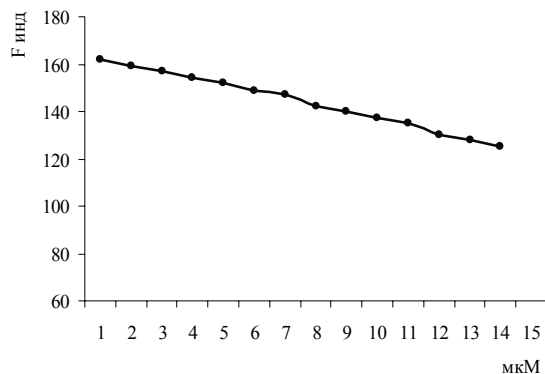


Рис. 1. Влияние налидиксовой кислоты на синтез белка *GFP* (плазмида *pRTGFPF2*).

По оси абсцисс – значения концентрации налидиксовой кислоты (1 деление = 1,25 мкМ). По оси ординат – значение фактора индукции (F инд)

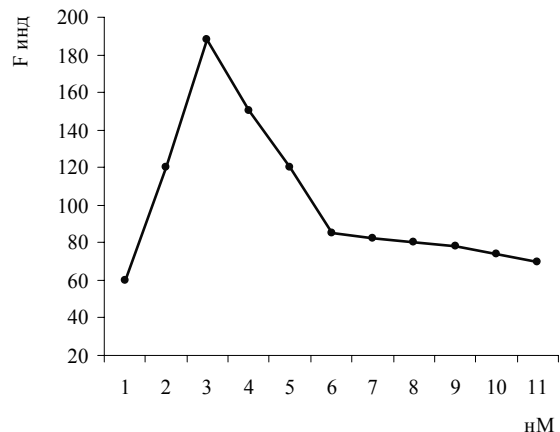


Рис. 2. Влияние митомицина С на синтез белка *GFP* (плазмида *pRTGFPF2*).

По оси абсцисс – значения концентрации митомицина С (1 деление = 1 нМ). По оси ординат – значение фактора индукции (F инд)

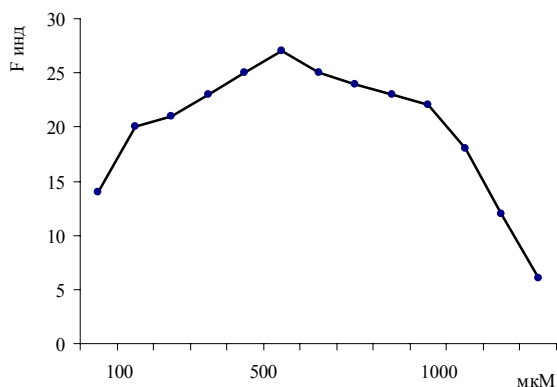


Рис. 3. Влияние перекиси водорода на синтез белка *GFP* (плазмида *pRTGFPF2*).

По оси абсцисс – значения концентрации перекиси водорода (1 деление = 100 мкМ). По оси ординат указано значение фактора индукции (F инд)

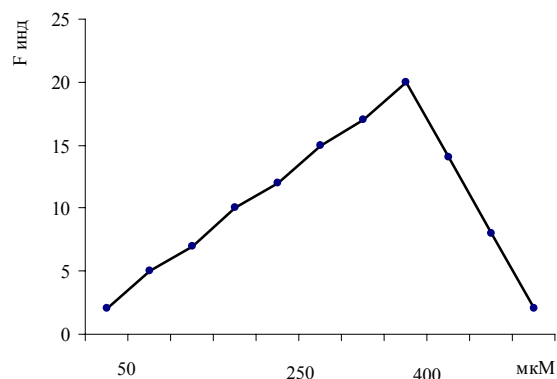


Рис. 4. Влияние формальдегида на синтез белка *GFP* (плазмида *pRTGFPF2*).

По оси абсцисс – значения концентрации формальдегида (1 деление = 50 мкМ). По оси ординат – значение фактора индукции (F инд)

использовании налидиксовой кислоты. Максимальный фактор индукции наблюдался при концентрации около 1 мкМ, при увеличении концентрации кислоты значение F инд снижалось, что очевидно связано с токсичностью налидиксовой кислоты. Отмечалось при этом также уменьшение абсолютного количества клеток *E. coli* и слипание их в тяжи, что легко регистрировалось микроскопически. Чувствительность созданной биосенсорной тест-системы на формальдегид и перекись водорода была выше, чем в работе [11]. Мы считаем, что критерий, использованный этими авторами для определения чувствительности биосенсорной тест-системы по минимальному уровню, доступному для определения, не совсем корректен, так как он зависит от

чувствительности используемой аппаратуры, чистоты реактивов, условий культивирования и других факторов. Поэтому мы использовали для оценки чувствительности биосенсорной тест-системы более адекватный критерий – максимально достигаемый F инд при определении генотоксинов. По этому критерию наша тест-система по некоторым показателям превосходит ранее описанную тест-систему [11]. Чувствительность нашей тест-системы не уступала *SOS*-хромотесту, *umi* тесту [12], *SOS lux* тесту [6; 13]. Однако преимуществом при использовании *recA::GFP* биосенсора является то, что при определении белка *GFP* не требуются дополнительных субстратов и АТФ, выделения люминесцирующего белка из клеток, а флуоресценцию легко детектировать

даже визуально. Основанный на флуоресцирующем белке *GFP* биосенсор может быть полезен для изучения генотоксического эффекта различных соединений, лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Отметим, что проверка данного биосенсора при экспозиции с бутанолом и ацетоном не приводила к увеличению флуоресценции. Таким образом, очевидно, наблюдаемые нами эффекты носят специфический характер. Флуоресценция в биосенсорной тест-системе стабильна и может наблюдаться в течение 1–2 суток без существенного снижения интенсивности флуоресценции, что облегчает работу при наличии значительного количества образцов и в полевых условиях определения.

Экспозиция биосенсорного штамма, несущего химерный ген *recA::GFP*, с генотоксическими соединениями приводит к возникновению яркой зеленой флуоресценции, которая количественно регистрируется. Фоновый уровень флуоресценции в данной биосенсорной тест-системе очень низок, что обеспечивает надежную регистрацию сигнала флуоресценции белка *GFP*. Биосенсорная тест-система, основанная на детекции индуцированного под влиянием генотоксинов синтеза флуоресцирующего белка *GFP*, имеет перспективу использования в биосенсорной технологии.

Список литературы

1. *Development of a biosensor test-system with gfp reporter protein for detection of DNA damages* / I. A. Lavrinenko, V. A. Lavrinenko, A. V. Ryabchenko et al. // Bull. Exper. Biol. Med. 2006. Vol. 141. P. 33–35.
2. *Distinct responses of a recA luxCDABE Escherichia coli strain to direct and indirect DNA damages agents* / J. Min, E. Kim, R. La-Rossa et al. // Mutat. Res. 1999. Vol. 442. P. 61–68.
3. *The Vitotox test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics* / D. VanDerLelie, L. Regniers, B. Borremans et al. // Mutat. Res. 1997. Vol. 389. P. 279–290.
4. *Justus T., Thomas S. Evaluation of transcriptional fusion with green fluorescent protein versus luciferase as reporter in bacterial mutagenicity tests* // Mutagenesis. 1999. Vol. 14. P. 351–356.
5. *Comparison of the Salmonella (Ames) test, umu tests and SOS chromotest for detecting genotoxins* / A. McDaniels, A. Reyes, L. Wymer et al. // Mol. Mutagenesis. 1990. Vol. 16. P. 204–215.
6. *Detection of DNA damage by use of Escherichia coli carrying recA::lux::, alkA::lux reporter plasmids* / A. Vollmer, S. Belkin, D. Smulski et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 2566–2571.
7. *A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant Escherichia coli strain* / L. Ptitsyn, G. Horneck, O. Komova et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63. P. 4377–4384.
8. *Rational design of gfp mutants as biosensor for bacterial endotoxins* / Y. Goh, V. Freser, B. How et al. // Protein engineering. 2004. Vol. 15. P. 493–502.
9. *Application of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms* / D. Erampalli, K. Leung, M. Cassidy et al. // J. Microbiol. Methods. 1999. Vol. 35. P. 187–199.
10. *William G. et al. An improved GFP cloning cassette designed for prokaryotic transcriptional fusions* / G. William, S. Miller, E. Lindow // Gene. 1997. Vol. 191. P. 149–153.
11. *Green fluorescent biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds* / M. Kostrzynska, K. Leung, H. Lee et al. // J. Microbiol. Methods. 2002. Vol. 48. P. 43–51.
12. *SOS chromotest a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K12 to measure genotoxicity* / P. Quillardet, O. Huisman, R. Ari et al. // Proc. Natl. Acad. Science USA. 1982. Vol. 7. P. 5971–5975.
13. *SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in Salmonella typhimurium Ta 1535 / pSK 1002; examination with 151 chemicals* / S. Nakamura, Y. Oda, T. Shimida et al. // Mutat. Research. 1987. Vol. 192. P. 239–246.

Материал принят в печать 18.10.2006

I. A. Lavrinenko, A. V. Ryabchenko, A. B. Beklemishev

Development of whole cell biosensor test-system for genotoxins influences on the cell

In the present research line *E. coli*, containing плазмиду *PRTGFP2* with cloning in it a gene of green fluorescing protein (*gfp*) from jellyfish *Aequorea victoria*, taking place under the control merged with this gene promoter *recA* which is induced by the damaging DNA of cells is used. The biosensor based on the control of synthesis of protein *gfp*, allows estimating the action of lines genotoxins on DNA of an alive cell.

Keywords: genotoxicity, biosensor, green fluorescing protein.