

Флуоресцентная микроскопия для визуализации взаимной локализации белков RecA и RecN внутри клеток *E.coli*

© В.А. Нестеренко, В.Д. Рощектаева, Н.Е. Морозова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: cool.olderin@yandex.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2025 г.

В окончательной редакции 23 июня 2025 г.

Принято к публикации 24 июня 2025 г.

Для визуализации белков SOS-ответа внутри клеток выполнено редактирование бактерий с целью создания штаммов с флуоресцентно-мечеными белками RecA и RecN в их геноме. При этом последовательность гена *recA* была слита с последовательностью флуоресцентного белка mNeonGreen, а последовательность гена *recN* была слита с последовательностью флуоресцентного белка mScarlet. Флуоресцентная визуализация полученного штамма показала синтез филаментов и фокусов белком RecA в процессе SOS-ответа бактерий, которые в некоторых случаях колокализуются с фокусами белка RecN.

Ключевые слова: SOS-ответ, белок RecA, белок RecN, CRISPR-Cas9, флуоресцентная микроскопия.

DOI: 10.61011/PJTF.2025.18.61087.8027

Флуоресцентная микроскопия является мощным методом молекулярной биологии, медицины и диагностики и позволяет получать важные данные о живых объектах, а также визуализировать молекулярные процессы в режиме реального времени. Это возможно благодаря флуоресцентному мечению клеточных структур или отдельных белковых молекул с помощью красителей или флуоресцентных белков и последующему возбуждению и детектированию их флуоресценции. Стремительное развитие флуоресцентной микроскопии благодаря совместным усилиям физиков, химиков и биологов привело к появлению новых методов. Помимо обычной дифракционно-ограниченной флуоресцентной микроскопии существуют различные методы и подходы, позволяющие значительно повышать разрешение изображений.

В настоящей работе методы широкопольной флуоресцентной микроскопии [1] использованы для визуализации механизма взаимодействия белков RecA и RecN в процессе SOS-ответа бактерий, вызванного повреждением их ДНК.

Белок RecA — рекомбиназа, являющаяся ключевым участником SOS-ответа и осуществляющая восстановление двунитевых разрывов ДНК посредством гомологичной рекомбинации. Также одним из важных участников SOS-ответа и гомологичной рекомбинации является белок RecN, представляющий один из ключевых партнеров RecA. Однако то, как именно RecN способствует поиску гомологичной ДНК для восстановления разрыва, остается слабо изученным. Ранее было установлено, что RecN привлекается к центрам репарации ДНК вместе с белком RecA, который является основным ферментом гомологической репарации и активатором SOS-ответа бактерий [2]. В предыдущих работах нами показано *in vitro* АТФ-зависимое связывание RecN преимущественно одонитевой ДНК. Также методами флуоресцентной микроскопии продемонстрировано, что вне SOS-ответа

RecN локализуется в центре активно делящихся клеток и на их полюсах, но не колокализуется с ДНК [3]. Однако эти данные были получены с помощью белков, принудительно экспрессирующихся в клетках даже без повреждения ДНК, что не позволяет прояснить все молекулярные механизмы функционирования белка RecN. В настоящей работе благодаря методам геномного редактирования с использованием технологий CRISPR-Cas [4] и гомологичной рекомбинации создавался штамм *E.coli*, несущий в своей хромосоме гены *recA* и *recN*, слитые с генами флуоресцентных белков mNeonGreen и mScarlet соответственно. Полученный штамм с модифицированным геномом позволяет установить локализацию белков RecA и RecN в процессе SOS-ответа бактерий.

Цель работы — получение штамма *E.coli* с флуоресцентно-мечеными белками RecA::mNeonGreen и RecN::mScarlet. В качестве начального штамма использовали штамм *E.coli* BL21AI.

Для проведения геномного редактирования была использована система CRISPR-Cas9 — одна из самых простых и наиболее изученных CRISPR-Cas-систем, эффекторный комплекс которой образован белком Cas9 и гидовой РНК, которая направляет Cas9 к нужной последовательности ДНК. Также была использована система рекомбинации Lambda-Red, позволяющая изменять геном *in vivo* за счет гомологичной рекомбинации. Система CRISPR-Cas9 вносила двуцепочечный разрыв в выбранном месте вставки целевых последовательностей. После этого запускалась гомологичная рекомбинация и происходила вставка последовательности из рекомбинационной матрицы.

Конструкции, кодирующие гидовую РНК, собирались методом клонирования СПЕС (circular polymerase extension cloning). Фрагменты для матриц рекомбинации

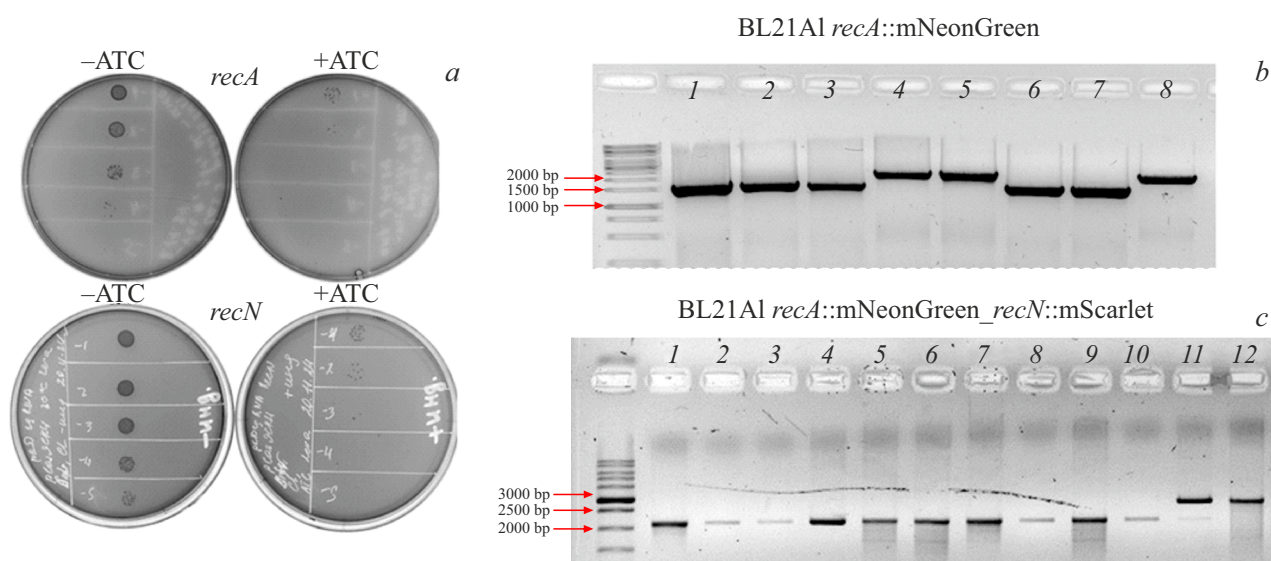


Рис. 1. Результаты экспериментов по редактированию генома. *a* — нацеливание системы CRISPR-Cas на гены интереса; *b* — ПЦР-скрининг колоний с геном *recA::mNeonGreen* (1–8 — номера колоний); *c* — ПЦР-скрининг колоний *E.coli* с геном *recN::mScarlet* (1–12 — номера колоний).

получали методом ПЦР, а затем собирали с помощью метода Гибсона.

Таким образом, для гена *recA* были получены следующие конструкции: кодирующая гидовую РНК плазмида pKDsgRNA-ack(*recA*); матрица для рекомбинации (*recA*+mNeonGreen) — линейный фрагмент, содержащий последовательность флуоресцентного белка mNeonGreen, фланкированную последовательностями генома *E.coli*. Для гена *recN* соответственно созданы конструкции pKDsgRNA-ack(*recN*), (*recN*+mScarlet), выполняющие те же функции.

Проверку того, как система CRISPR-Cas нацеливается на гены интереса, осуществляли следующим образом: сначала производилась культивация клеточных культур, несущих плазмиды, содержащие систему CRISPR-Cas и требуемую гидовую РНК. Затем разведения клеточной культуры на 1–6 порядков наносились каплями по 5 μ l на чашки Петри с 1.5% агаризованной средой LB (на 500 ml воды: 5g триптон, 2.5g дрожжевой экстракт, 5g хлорид натрия, 7.5g микробиологический агар) с индуктором ангидротетрациклином (ATC) и без него и помещались в термостат (BD 53, Binder) при температуре 30 °C на сутки.

На первом этапе геномного редактирования генетические конструкции, требуемые для флуоресцентного мечения *recA*, последовательно вносились в клетки путем электропорации. Затем в культуру добавляли 50 mM арабинозы для индукции системы рекомбинации Lambda Red и ATC для экспрессии нуклеазы Cas9. Далее разведения клеточной культуры наносились на чашки Петри с добавлением ATC. После этого отредактированные колонии проверяли с помощью ПЦР-скрининга.

Прежде чем проводить редактирование гена *recN*, необходимо было удалить плазмиду pKDsgRNA-ack(*recA*), содержащую гидовую РНК к спейсеру *recA*, чтобы потом поместить в клетки плазмиду pKDsgRNA-ack(*recN*). Плазмиды вида pKDsgRNA-ack являются термочувствительными и при 37 °C удаляются из клетки, поэтому отредактированные клетки инкубировали при данной температуре и также не добавляли селективный антибиотик удаляемой плазмиды (спектиномицин).

Второй этап геномного редактирования проводился подобно первому, в клетки помещали генетические конструкции, требуемые для флуоресцентного мечения гена *recN*. После редактирования клеточные колонии также проверяли с помощью ПЦР-скрининга.

После успешного геномного редактирования была проведена флуоресцентная микроскопия, в результате которой была детектирована локализация белка RecA::mNeonGreen в клетках в нормальных условиях и в состоянии SOS-ответа. Также была визуализирована совместная локализация белков RecA::mNeonGreen и RecN::mScarlet в *E.coli* в нормальных условиях и в состоянии SOS-ответа. Для активации SOS-ответа отбирали 1 ml бактериальной культуры и облучали ультрафиолетом в течение 1 min. После этого культуры инкубировали 20 min в термошейкере (TS-100, BioSan) при 37 °C.

Стекла для проведения съемки готовили следующим образом: 500 μ l 1.5% агарозы, растворенной в буфере 1X TAE (40 mM Трис, 20 mM уксусной кислоты, 1 mM EDTA на 1 l воды, pH = 8), наносили на предметное стекло и придавливали вторым предметным стеклом для формирования ровной подложки. После высыхания ага-

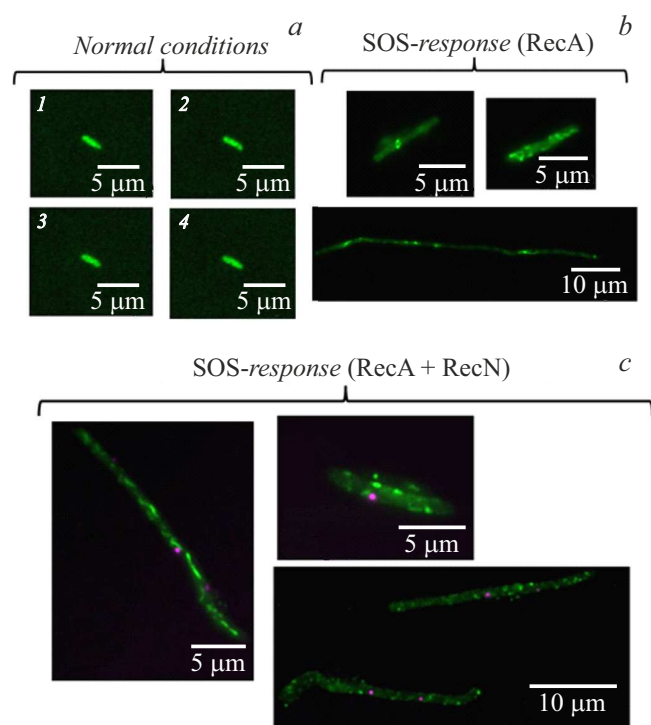


Рис. 2. Визуализация RecA::mNeonGreen (зеленый) в нормальных клетках *E. coli* (a) и в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа (b). c — локализация RecA::mNeonGreen (зеленый) и RecN::mScarlet (фиолетовый) в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа. Цветной вариант рисунка представлен в электронной версии статьи.

розы верхнее стекло удалялось. Далее на сформированную подложку наносился 1 μ l клеточной культуры, который после высыхания накрывался покровным стеклом. Съемка проводилась на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse Ti-E с объективом с увеличением 100 $\times$ и масляной иммерсией. Изображения регистрировались в трех каналах: в режиме проходящего света, в зеленом флуоресцентном канале для регистрации флуоресценции RecA::mNeonGreen (облучение длиной волны 506 nm, детектирование на длине волны 517 nm), в красном флуоресцентном канале для регистрации RecN::mScarlet (облучение длиной волны 569 nm, детектирование на длине волны 594 nm). Все изображения были получены с помощью sCMOS камеры Zyla 4.2 (Andor).

Нацеливание системы CRISPR-Cas на гены *recA* и *recN* оказалось успешным. На изображениях, представленных на рис. 1, a, видно, что при добавлении индуктора АТС количество колоний в каждом разведении заметно снижается, что свидетельствует о том, что система CRISPR-Cas эффективно нацеливается на выбранную мишень.

Получены штаммы *E. coli*, содержащие ген *recA*::mNeonGreen, а также оба гена *recA*::mNeonGreen и *recN*::mScarlet.

Результаты первого этапа геномного редактирования представлены на рис. 1, b. С помощью ПЦР-скрининга были проверены клеточные колонии, в которых проводилось редактирование гена *recA*. Отредактированные колонии должны иметь длину ПЦР-фрагмента 2000 bp. Видно, что в колониях 4, 5 и 8 редактирование прошло успешно.

Результаты второго этапа геномного редактирования представлены на рис. 1, c. Также с помощью ПЦР-скрининга были проверены клеточные колонии, в которых проводилось редактирование гена *recN*. Отредактированные колонии должны иметь длину ПЦР-фрагмента 2700 bp. Видно, что в колониях 11 и 12 редактирование прошло успешно.

С помощью флуоресцентной микроскопии были получены изображения клеток *E. coli* BL21AI RecA::mNeonGreen_RecN::mScarlet в нормальных условиях и в состоянии SOS-ответа. Из рис. 2, a видно, что белок RecA экспрессируется в клетках и вне состояния SOS-ответа, а также активно перемещается по ним (представлены последовательные кадры 1–4 одной и той же клетки с разницей в 1 s). Во время активации SOS-ответа (рис. 2, b) можно наблюдать, как белок RecA образует филаменты внутри клеток. Также были получены изображения клеток с двумя флуоресцентно-мечеными белками RecA и RecN во время SOS-ответа (рис. 2, c). Без активации SOS-ответа белок RecN в клетке не визуализируется. Во время SOS-ответа количество белка RecN в клетке намного меньше, чем RecA. В некоторых случаях белки колокализуются.

Таким образом, получен штамм *E. coli* с флуоресцентно-мечеными белками RecA и RecN. С помощью флуоресцентной микроскопии получены изображения локализации белков интереса в нормальных условиях и в состоянии SOS-ответа. В нормальных условиях белок RecN в клетке отсутствует, а белок RecA активно перемещается по клетке. В состоянии SOS-ответа белок RecA образует филаменты внутри клеток, на поздних стадиях SOS-ответа визуализируются фокусы RecA. Белок RecN также образует фокусы в процессе SOS-ответа, которые в некоторых случаях колокализуются с фокусами RecA. При этом белка RecN в клетках гораздо меньше, чем белка RecA.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-00085 (<https://rscf.ru/project/24-74-00085/>).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] S.J. Sahl, S.W. Hell, S. Jakobs, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **18** (11), 685 (2017). DOI: 10.1038/nrm.2017.71
- [2] K. Keyamura, C. Sakaguchi, Y. Kubota, H. Niki, T. Hishida, J. Biol. Chem., **288**, 29229 (2013). DOI: 10.1074/jbc.M113.485474
- [3] V.D. Roshektaeva, A.A. Alekseev, A.D. Vedyaykin, V.A. Vinnik, D.M. Baitin, I.V. Bakhlanova, G.E. Pobegalov, M.A. Khodorkovskii, N.E. Morozova, Biochem. Biophys. Res. Commun., **716**, 150009 (2024). DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.150009
- [4] J.A. Doudna, E. Charpentier, Science, **346** (6213), 1258096 (2014). DOI: 10.1126/science.1258096