

УДК 57.083.1: 579.842.11: 613.165.6: 577.112

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ

Рябченко А.В., Беклемишев А.Б.

ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: borrelia@mail.ru

В работе представлен материал по апробации биосенсора на основе клеток *Escherichia coli* (*E.coli*), для обнаружения антирадикальной активности веществ. В качестве источника радикалов использовалось ультрафиолетовое облучение (УФО). Клетки *E.coli* содержали плазмиду pRAC с клонированным геном зеленого флюоресцирующего белка, под регуляторной областью *recA*-промотора *Proteus mirabilis*. Клетки биосенсора в ответ на воздействие УФО синтезировали зеленый флюоресцирующий белок, который легко регистрировался флуориметром *in situ*. В случае если добавляемое к культуре биосенсора вещество обладало антирадикальной активностью, флуоресценция клеток снижалась. В качестве антирадикальных веществ были исследованы аскорбиновая кислота, метилэтилпиридинол (торговое название «Эмоксипин»), «Тиофан» и «Тиофан-М». Во всех случаях было отмечено достоверное снижение флуоресценции клеток биосенсора примерно на 10-20%. Биосенсор может быть пригоден для первичного скрининга и выявления антирадикальной активности различных, не токсичных для *E.coli*, веществ.

Ключевые слова: биосенсор, *E.coli*, зеленый флюоресцирующий белок (*gfp*), антирадикальная защита, ультрафиолетовое облучение (УФО)

MICROBIOLOGICAL BIOSENSORS FOR DETECTION OF ANTIRADICAL ACTIVITY OF VARIOUS SUBSTANCES

Ryabchenko A.V., Beklemishev A.B.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of Biochemistry» under the Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, e-mail: borrelia@mail.ru

In the work presented by the material testing biosensor cell based on the *Escherichia coli* (*E.coli*), for detecting the antiradical activity of substances. As a source of radicals used ultraviolet radiation (UVR). Biosensor cells containing plasmid pRAC. The structure region of fluorescent *gfp* gene was cloned into these plasmid under the *recA*-promoters *Proteus mirabilis*. Biosensor cells under UVR initiated repair SOS-mechanism and synthesized green fluorescent protein, which is easily measured by fluorimeter device *in situ*. If the substance has antiradical activity, cell fluorescence decreased. As antiradical substances have been investigated ascorbic acid, metiletilpiridinol (trade name «Emoksipin»), «Thiophane» and «Thiophane-M». In all cases there was a significant decrease in cell fluorescence biosensor about 10-20%. Biosensor may be useful for primary screening and detection of antiradical activity of different substances, non-toxic for *E.coli*.

Keywords: biosensor, *E.coli*, green fluorescent protein (*gfp*), antiradical protection, ultraviolet radiation (UVR)

Ранее в нашей лаборатории был сконструирован биосенсор для обнаружения генотоксического воздействия (повреждение ДНК или ферментативного аппарата обслуживающего геном клетки) различных веществ на клетку. Известно, что при повреждениях ДНК в клетке и, в частности, в *E.coli*, запускается SOS-система репарации ДНК, впервые описанная в 1975 г. М. Радманом [8]. При запуске SOS-системы активируется промотор *recA*-гена, отвечающего за синтез соответствующего RecA-белка, который играет ключевую роль в нескольких путях репарации повреждений ДНК [7]. Ранее нами была сконструирована плазмидная ДНК (pRAC), содержащая ген зеленого флюоресцирующего белка под регуляторной областью промотора *recA*-гена *Proteus mirabilis*. Плазмидная ДНК была встроена в клетки кишечной палочки. Таким образом, биосенсор был основан на клетках *E.coli* штамм BL21(DE3) и при нарушении генетического аппарата клетки биосенсора продуцировали зеленый флюоресцирующий белок (GFP), который легко регистрировался флуориметром непосредственно

в культуре клеток [6]. В качестве генотоксикантов нами были проверены формальдегид, митомицин С, налидиксовая кислота, перекись водорода и ультрафиолетовое облучение (УФО с длинной волны ~254 нм). Эксперименты показали, что клетка отвечает синтезом GFP на все исследованные мутагены и в основном дозозависимым образом [2, 5].

Помимо промотора *recA*-гена в литературе описаны конструкции другими промоторами генов SOS-репаративного ответа [9]. Однако все эти конструкции использовались для непосредственного определения генотоксикантов (прямой анализ), и нет работ, где с помощью этих конструкций определялись бы эффекты, направленные на подавление или устранение эффекта генотоксиканта (своего рода «обратный» анализ). Поскольку УФО ведет к образованию свободных радикалов в клетке, мы предположили возможность использования данной модели для обнаружения защитных эффектов различных веществ, обладающих антирадикальной активностью. При добавлении таких веществ к клеткам

биосенсора в условиях стресса – под действием УФО, уровень флуоресценции клеток должен снижаться. Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования биосенсора – клеток *E.coli* шт. BL21(DE3), содержащих плазмиду pRAC, для обнаружения антирадикальной активности различных веществ.

Материалы и методы исследования

В качестве биосенсора использовались клетки *E.coli* штамм BL21(DE3), содержащие плазмиду

pRAC и обладающие устойчивостью к ампициллину. В качестве веществ, обладающих антирадикальной активностью исследовались аскорбиновая кислота (5% раствор, ЗАО «Новосибхимфарм», г. Новосибирск, Россия), метилэтилпиридинол (торговое название «Эмоксипин», 1% раствор, ФГУП «Московский эндокринный завод», г. Москва, Россия), бис-[(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид («Тиофан») и 4-додецил-тиометил-2,6-диметилфенол («Тиофан-М») (кафедра химии, Институт естественных и социально-экономических наук, г. Новосибирск, Россия), структурные формулы веществ представлены на рис. 1.

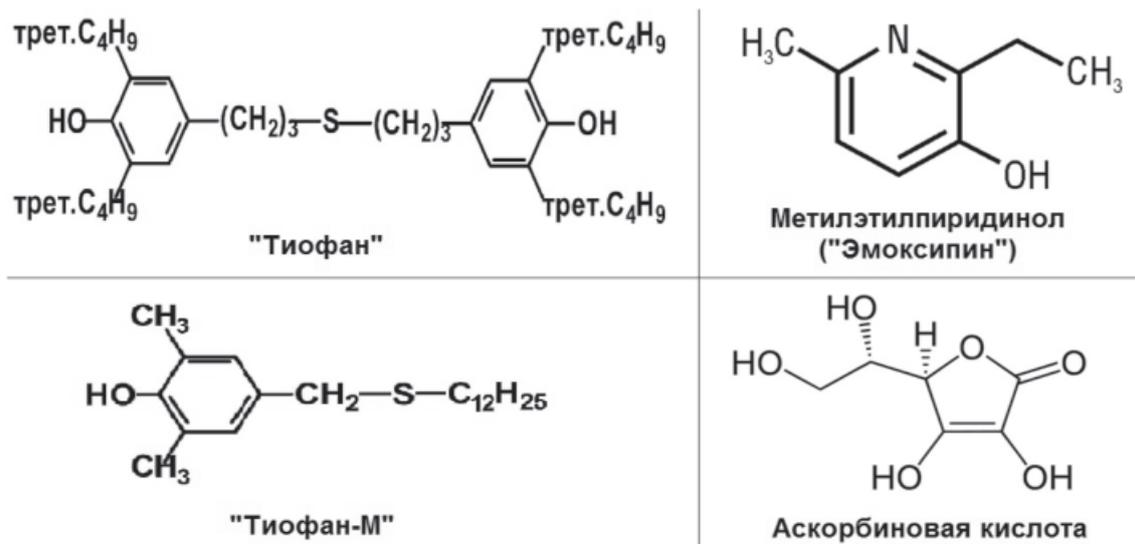


Рис. 1. Структурные формулы исследованных веществ

Клетки выращивали на среде Луриа–Бертани, содержащей ампициллин 100 мкг/мл, в колбе на ротационном шейкере при 37°C. Культуру клеток в логарифмической фазе роста (1,0–1,5 о.е., D600) разливали в культуральные полистироловые планшеты (по 1 мл в лунку) и добавляли в различных концентрациях исследуемые вещества. Клетки инкубировали на ротационном шейкере (180 об/мин) в течение 20–30 мин при комнатной температуре, после чего планшеты инкубировали при аналогичных условиях под УФО в течение необходимого периода. В качестве источника УФО использовалась лампа ртутная бактерицидная ДБ-60 ($\lambda \sim 254$ нм, мощность 60 Вт), расстояние от лампы до планшетов составляло 50 см. По окончании инкубации проводился замер оптической плотности (ОП) культуры клеток (спектрофотометр «Evoluion 300 V-VIS», США) и флуоресценции (флуориметр «Shimadzu RF-530» (PC), Япония). Измерения проводили непосредственно в культуре клеток, без их разрушения. Волна возбуждения зеленого флуоресцирующего белка 480 нм, эмиссии – 515 нм.

Для сравнения результатов исследуемых культур флуоресценцию нормировали на оптическую плотность культуры клеток и вычисляли фактор индукции (ФИ) по методу, описанному в работе Лавриненко [2]. Каждый образец повторяли три раза. Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. В сравниваемых группах определяли средние величины (М), ошибку средних величин ($\pm m$). Математическую обработку

выполняли с помощью программы «StatPlus 2009» (компания «StatSoft», USA). Аскорбиновая кислота и метилэтилпиридинол являются водорастворимыми веществами. Растворы «Тиофана» и «Тиофана-М» с высокой концентрацией веществ готовили в 100% диметилсульфоксиде, до исследуемых концентраций вещества растворяли 96% этанолом, поэтому контрольные клетки содержали аналогичный объем растворителя без исследуемых веществ.

Результаты исследования и их обсуждение

На предварительном этапе работ было исследовано время экспозиции клеток биосенсора под УФО для выбора оптимальных условий инкубации. Клетки инкубировали в течение суток под УФО. Через определенный промежуток времени ряд лунок экранировался от УФО, контрольные лунки были экранированы с начала инкубации. По окончании инкубации производились соответствующие замеры, вычисления фактора индукции и построение кривых изменения ОП и ФИ от времени. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

Из графика видно, что ОП клеток уменьшается в результате угнетающего действия УФО, а флуоресценция увеличивается

вследствие накопления в клетках GFP. Из результатов этого эксперимента следует, что в исследованные периоды максимальной ФИ приходится на четырехчасовой период инкубации, т.е. в этой точке флуоресценция облучаемых клеток в восемь

раз больше, чем в контрольных. Мы посчитали эту разницу вполне достаточной для проявления антирадикальных защитных эффектов, поэтому в последующих экспериментах остановились на четырехчасовой инкубации клеток.

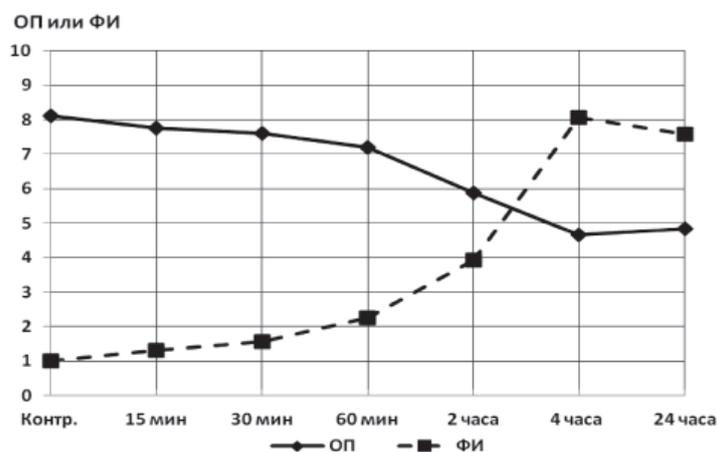


Рис. 2. Кривые изменения ОП культуры клеток и ФИ под действием УФО. По оси ординат отложены единицы ОП культур и ФИ, по оси абсцисс – время инкубации клеток. ФИ контрольных клеток принят за единицу

В качестве веществ, обладающих антирадикальными свойствами, нами были выбраны такие общепризнанные вещества, как аскорбиновая кислота и метилэтилпиридинол. И два синтетических фенольных антиоксиданта «Тиофан» и «Тиофан-М», обладающих двумя группами, обуславливающими их антиоксидантные и антирадикальные свойства. Антиоксидантные свойства проявляются в основном за счет содержания атома серы в структуре данных соединения [1]. Имеется работа по исследованию выживаемости клеток *E.coli* в условиях перекисного стресса [4], где показано, что добавление в культуральную среду про-

изводных соединений данных веществ приводило к увеличению выживаемости клеток. Антирадикальные свойства «Тиофана» и «Тиофана-М» обусловлены наличием в их структурах фенольной группировки, которая выступает «ловушкой» для радикалов, аналогично механизму, описанному для фенольного антиоксиданта 2,6-ди-трет-бутил-4-метил-фенола – «Ионол» [3]. Поэтому мы предположили, что и в наших экспериментах эти фенольные антиоксиданты должны проявить антирадикальную активность. Вещества исследовались в конечных концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. Результаты исследования представлены в таблице.

Флуоресценция клеток с исследуемыми веществами, выраженная в процентах относительно контрольных, ФИ контрольных клеток принят за 100% ($M \pm m, n = 3$)

Исследуемое вещество	Концентрация исследуемого вещества			
	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
«Тиофан»	99,2 ± 2,7	96,7 ± 4,9	93,2 ± 3,7*	91,2 ± 1,8*
«Тиофан-М»	100,5 ± 2,1	100,8 ± 4,1	96,3 ± 4,8	90,1 ± 4,2*
Метилэтилпиридинол	98,3 ± 3,2	95,0 ± 5,8	88,7 ± 5,8*	80,3 ± 2,9*
Аскорбиновая кислота	95,6 ± 4,5	85,1 ± 5,4*	82,0 ± 4,1*	86,2 ± 4,2*

Примечание. * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

В результате этих исследований была выявлена закономерность, которая выражалась в статистически достоверном снижении флуоресценции культуры клеток при повышении концентрации исследуемого

вещества. Чем выше была концентрация исследуемого вещества, тем меньше флуоресцировала культура клеток относительно контрольных. Таким образом, добавление к культурам клеток биосенсора

исследованных веществ в основном дозозависимым образом вело к снижению уровня флуоресценции культур, т.е. можно предполагать, что происходило снижение уровня повреждения ДНК клеток.

Результаты показывают, что максимальное снижение флуоресценции происходит почти на 20% в случае метилэтилпиридинола и аскорбиновой кислоты, в случае «Тиофана» и «Тиофана-М» – почти на 10%. Таким образом, добавление исследованных веществ к клеткам оказывало защитный эффект от УФО. Вероятно, это происходит в результате снижения концентрации свободных радикалов в клетке за счет добавленных в культуру исследованных веществ. Мы предполагаем, что данные цифры могут быть более наглядными, т.е. разница с контрольными клетками может быть большей при оптимизировании условий эксперимента. В частности, при изменении дозы УФО путем изменения времени инкубации клеток либо замены источника УФО.

Заключение

Данные результаты позволяют сделать вывод о пригодности исследуемого биосенсора для обнаружения антирадикальной активности веществ в условиях жесткого ультрафиолетового облучения клеток биосенсора. Биосенсор может быть пригоден для первичного скрининга и выявления антирадикальной активности различных, не токсичных для *E.coli*, веществ и может найти применение в фармакологии.

Список литературы

1. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С., Прошенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Биохимия – 2007. – Т. 72. – № 6. – С. 790–798.
2. Лавриненко И.А., Рябченко А.В., Беклемишев А.Б. Создание цельноклеточной биосенсорной тест-системы для обнаружения генотоксических воздействий на клетку // Вестник НГУ. – 2007. – Т. 5, № 1. – С. 95–99.
3. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. Строение свойства, механизмы действия – Германия: Изд-во Lap Lambert Academic Publishing, 2012 – 496 с.
4. Роккая У.Н., Овчинникова Л.П., Васюнина Е.А., Синицина О.И., Кандалинцева Н.В., Прошенко Е.А., Невинский Г.А. Оценка цитотоксичности и эффективности антиоксидантных свойств гидрофильных производных 2,4,6-триалкилфенолов в клетках *Escherichia coli* // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57. – № 3. – С. 326–334.
5. Рябченко А.В. Получение рекомбинантных белков западносибирских изолятов *Borrelia burgdorferi sensu lato* и изучение их антигенных свойств: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Новосибирск, 2009 – 20 с.

6. Рябченко А.В., Лавриненко И.А., Беклемишев А.Б. Рекомбинантная плазмидная ДНК для обнаружения агентов, повреждающих генетический аппарат клетки (варианты) // Патент России № 2311459. 2007.

7. Kostrzynska M., Leung K., Lee H., Trevors J. Green fluorescent biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic com-pounds // J. Microbiol. Methods. – 2002. – Vol. 48. – P. 43–51.

8. Radman M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair pichulein hypothesis // Basic Life Sciences 5A. – 1975. – P. 355–367.

9. Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol.73. – P. 1251–1258.

References

1. Zenkov N.K., Men'shikova E.B., Kandalinceva N.V., Olejnik A.S., Prosenko A.E., Gusachenko O.N., Shklyajeva O.A., Vavilin V.A., Ljahovich V.V. Antioksidantnye i protivovospalitel'nye svojstva novyh vodorastvorimyh serosoderzhashhh fenol'nyh soedinenij // Biohimija 2007. T. 72. no. 6. pp. 790–798.
2. Lavrinenko I.A., Rjabchenko A.V., Beklemishev A.B. Sozdanie cel'no-kletочноj biosensornoj test-sistemy dlja obnaruzhenija genotoksicheskikh vozdeystvij na kletku // Vestnik NGU. 2007. T. 5, no. 1. pp. 95–99.
3. Men'shikova E.B., Lankin V.Z., Kandalinceva N.V. Fenol'nye antioksidanty v biologii i medicine. Stroenie svojstva, mehanizmy dejstvija Germanija: Izdatel'stvo Lap Lambert Academic Publishing, 2012 496 p.
4. Rockaja U.N., Ovchinnikova L.P., Vasjunina E.A., Sinicina O.I., Kandalinceva N.V., Prosenko E.A., Nevinskij G.A. Ocenka citotoksichnosti i jeffektivnosti antioksidantnyh svojstv gidrofil'nyh proizvodnyh 2,4,6-trialkilfenolov v kletkah *Escherichia coli* // Biomedicinskaja himija. 2011. T. 57. no. 3. pp. 326–334.
5. Rjabchenko A.V. Poluchenie rekombinantnyh belkov zapadnosibirskih izoljatov *Borrelia burgdorferi sensu lato* i izuchenie ih antigennyh svojstv: Avtoref. dis. kand. biol. nauk. Novosibirsk, 2009 20 p.
6. Rjabchenko A.V., Lavrinenko I.A., Beklemishev A.B. Rekombinantnaja plazmidnaja DNK dlja obnaruzhenija agentov, povrezhdajushhh geneticheskij apparat kletki (varianty) // Patent Rossii no. 2311459. 2007.
7. Kostrzynska M., Leung K., Lee H., Trevors J. Green fluorescent biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic com-pounds // J. Microbiol. Methods. 2002. Vol. 48. pp. 43–51.
8. Radman M. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair pichulein hypothesis // Basic Life Sciences 5A. 1975. pp. 355–367.
9. Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 73. pp. 1251–1258.

Рецензенты:

Усынин И.Ф., д.б.н., заведующий лабораторией «Молекулярная биология клетки», ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, г. Новосибирск;

Потеряева О.Н., д.м.н., профессор кафедры медицинской химии, ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 31.01.2014.