Взаимная локализация белков SOS-ответа в клетках *E. coli*

© Р.А. Кряжев, В.Д. Рощектаева, Е.Р. Тухватуллина, Н.Е. Морозова

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ruslan.kryajev@yandex.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2026 г.
В окончательной редакции 24 июня 2026 г.
Принято к публикации 23 октября 2026 г.

Для визуализации белков SOS-ответа в клетках *E. coli* была произведена микроскопия на агарозной подложке, в промываемой камере с фиксацией на поли-L-лизине и в микрофлюидной камере. Флуоресцентная визуализация клеток кишечной палочки в SOS-ответе указывает на локализацию RecN на полюсах и в центральной части клеток. Фокусы RecN в основном колокализуются с филаментами RecA. Локализационная микроскопия с окрашиванием белков RecA, RecN и ДНК показала, что в нормальных условиях белок RecN образует структуры, которые окружают молекулы ДНК. RecA в свою очередь образует спиралевидные структуры, обвивающие RecN и ДНК. При SOS-ответе белок RecN находится на полюсах клеток или в центральной области. Предполагается, что такое расположение не случайно и зависит от положения ДНК в клетке.

Ключевые слова: RecA, RecN, SOS-ответ, локализационная микроскопия.

DOI: 10.61011/PJTF.2026.23.64014.9753k

SOS-ответ — это состояние бактериальной клетки, возникающее в ответ на повреждение ДНК и направленное на восстановление целостности генома. SOS-ответ является комплексным механизмом, который позволяет клеткам восстанавливать двунитевые разрывы ДНК, а также помогает бактериям адаптироваться к действию антибиотиков [1]. Причинами возникновения одно- и двунитевых разрывов в бактериальном геноме могут быть различные факторы: перекись водорода, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, а также некоторые антибиотики. В ответ на повреждение клетка активирует механизмы, направленные на восстановление целостности ее генома. Для этого изменяется структура хроматина и задействуются специфические пути репарации, одним из которых и является SOS-ответ [2].

Одним из ключевых участников SOS-ответа является белок RecA. Он играет центральную роль в процессах восстановления ДНК, рекомбинации и активации SOS-ответа [3]. При повреждении ДНК бактериальная клетка формирует филаменты RecA, которые стимулируют расщепление белка LexA. LexA блокирует экспрессию более чем пятидесяти SOS-генов, поэтому его расщепление активирует процесс SOS-ответа [4]. Основной функцией RecA является осуществление гомологичной рекомбинации с образованием D-петель [5].

Другим важным белком SOS-ответа является SMC-подобный белок RecN. Белки семейства SMC необходимы клетке для сегрегации и компактизации хромосом, некоторые из них играют существенную роль в процессе SOS-ответа. RecN участвует как в RecFOR-, так и в RecBCD-зависимых путях рекомбинационного восстановления генома. RecN стимулирует межмолекулярные взаимодействия ДНК и обладает АТФазной активностью [1]. Этот белок может взаимодействовать не только с RecA, но и с другими белками, участвующими в восстановлении ДНК (PNPase) и репликации (PolC, HolB и DnaX) [2]. Исследования указывают на то, что белок RecN предпочтительно связывается с одноцепочечной ДНК и в дальнейшем может перемещаться на двуцепочечную ДНК [5].

Для визуализации описанных белков нами было проведено геномное редактирование клеток *E. coli* BL21AI с целью получения флуоресцентно-меченых белков RecA::mNeonGreen и RecN::mScarlet [6].

Цель работы — получение данных о взаимной локализации белков RecA и RecN в клетке модифицированного штамма *E. coli.*

Для исследования локализации целевых белков была использована широкопольная микроскопия с различными методами размещения клеток, а также локализационная микроскопия.

В первом случае для проведения широкопольной микроскопии изготавливали агарозный слайд по методике, описанной ранее [7].

Во втором случае для проведения широкопольной микроскопии была изготовлена промываемая камера. Для этого по краям предметного стекла нанесли двухсторонний скотч толщиной около 100 μm. На одну сторону покровного стекла нанесли около 100 μl поли-L-лизина, который равномерно распределили по поверхности с помощью спин-коатера. Далее покровное стекло промыли в воде MQ. Затем покровное стекло приклеили с помощью двухстороннего скотча к предметному стеклу и дополнительно зафиксировали с помощью фотополимеризующегося гибридного лака. Далее в камеру поместили 100 μl культуры и герметично запечатали края растопленной смесью VaLaP.

Для работы с микрофлюидными чипами клетки *E. coli* выращивали в термошейкере при 37 °C в течение ночи в питательной среде LB. После этого 100 μl полученной

ночной культуры пересадили в 10 ml свежей среды LB и культивировали до $OD_{600} = 0.25$. Микрофлюидную камеру на основе PDSM промывали средой LB с помощью системы трубок, шприца и шприцевого насоса RAZEL R99-E. Далее в камеру вмывали около 100 μl бактериальной культуры *E. coli* ($OD_{600} = 0.25$). Микрофлюидную камеру прокручивали в течение 10 s на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R с ротором A-2-DWP с ускорением 500g (около 1700 rpm) для адсорбции клеток в карманах микрофлюидной камеры. Во время эксперимента в чип подавали питательную среду LB.

Все снимки для широкопольной микроскопии были получены с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E с иммерсионным объективом Nikon CFI Plan Apochromat VC 100× (NA 1.40, WD 0.13 mm). Съемку производили в трех каналах: в режиме проходящего света (600 ms), в зеленом флуоресцентном канале (фильтр YFP-2427B (Semrock), возбуждение — 506 nm, детектирование — 517 nm, 500 ms) и красном флуоресцентном канале (фильтр TXRED-4040C (Semrock), возбуждение — 569 nm, детектирование — 594 nm, 500 ms). Все изображения были получены с помощью sCMOS камеры Zyla 4.2 (Andor).

Для исследования локализации белков методом локализационной микроскопии клетки кишечной палочки культивировали на среде LB в течение ночи при 37 °C. На следующий день полученную культуру перенесли в свежую среду M9 в соотношении 1:100 и культивировали до $OD_{600} = 0.5$. Клетки подготавливали по ранее использованному протоколу с изменениями [7]. Вместо антител к FtZ использовали антитела к mNeonGreen, а для окрашивания ДНК использовали краситель DAPI.

Микрофотографии получены с помощью микроскопа Zeiss AxioImager.Z1, охлаждаемой камеры EM-CCD Andor iXon 897 и иммерсионного объектива Zeiss alpha Plan-Apochromat 100×/1.46 Oil DIC M27. Съемка производилась в четырех каналах: красный для визуализации белка RecN::mCherry (mCherry-40LP-A-000 (Semrock), возбуждение — 532 nm, детектирование — 647 nm, 50 ms), зеленый для визуализации RecA::mNeonGreen (Filter set 10 (Carl Zeiss), возбуждение — 450–490 nm, детектирование — 515–565 nm, 50 ms), дальний красный для визуализации антител к mNeonGreen (LF635/LP-B-000 (Semrock), возбуждение — 635 nm, детектирование — 660 nm, 50 ms) и в канале DAPI для визуализации ДНК (DAPI-50LP-A-000 (Semrock), возбуждение — 405 nm, детектирование — 409 nm, 50 ms).

В описанных экспериментах использовали две методики активации SOS-ответа. Для индукции SOS-ответа с помощью ультрафиолета 1 ml свежей культуры клеток помещали в пластиковую центрифужную пробирку на 15 ml, распределив слой жидкости равномерно, и подвергали воздействию ультрафиолета в течение 1 min с помощью трансиллюминатора. После этого клетки культивировали в течение 20 min в термошейкере при 37 °C. Для индуцирования SOS-ответа с помощью ципрофлоксацина клетки кишечной палочки культивировали до необходимого значения оптической плотности, добавляли 0.3 % раствор ципрофлоксацина до конечной концентрации 6 μg/ml и культивировали еще 1.5 h при 37 °C.

На микрофотографиях клеток, иммобилизованных на агарозной подложке, видно, что плотная питательная среда ограничивает их рост и время деления увеличивается: в течение трехчасовой съемки удавалось зафиксировать лишь два-три деления. Тем не менее нам удалось визуализировать флуоресцентно-меченые белки RecA и RecN как в нормальных условиях, так и при активации SOS-ответа введением ципрофлоксацина (рис. 1, *a, b*). На рис. 1, *a* видно, что RecN локализуется преимущественно у полюсов клеток или в центральной области. Кроме того, RecN располагается в непосредственной близости от филаментов RecA.

Для улучшения условий культивирования бактерий клетки *E. coli* фиксировали на поли-L-лизине и использовали жидкую питательную среду в качестве субстрата. Однако при делении дочерние клетки не закреплялись на поверхности стекла и покидали поле зрения. Также поли-L-лизин вследствие своей токсичности вызывал повреждение клеток, что затрудняло интерпретацию результатов.

Таким образом, был опробован еще один подход — рост бактерий в микрофлюидных устройствах. В микрофлюидном чипе мы смогли получить удовлетворительные результаты: клетки активно делились, синтез RecN не наблюдался. Однако зарегистрировать SOS-ответ на введение ципрофлоксацина на данный момент не удалось. На рис. 2 видно, что клетки изменяют морфологию, что указывает на необходимость оптимизации методики их культивирования в микрофлюидном чипе. В будущем планируется заменить питательную среду и применить различные виды предварительной обработки камеры для повышения гидрофильности ее поверхности.

Наконец, с помощью локализационной микроскопии были получены снимки, представленные на рис. 3. На рис. 3 (верхний ряд) видно, что в отсутствие SOS-ответа белок RecN располагается не только на полюсах клетки, но и обвивает молекулы ДНК. В свою очередь белок RecA образует спиралевидные структуры, располагающиеся вокруг ДНК и белка RecN. При индуцировании SOS-ответа таких особенностей взаимного расположения RecN и ДНК установить на данный момент не удалось, однако на рис. 3 (нижний ряд) можно наблюдать, что распределение филаментов RecA в клетке напоминает спираль. При этом фокусы RecN колокализуются с RecA в 75.26 % фокусов (рис. 4, *a*).

В дальнейшем планируется визуализировать локализацию целевых белков в живых клетках при одновременном окрашивании ДНК. Нами будут испробованы другие красители для ДНК, так как воздействие DAPI на молекулы ДНК *E. coli* само по себе способно приводить к их компактизации.

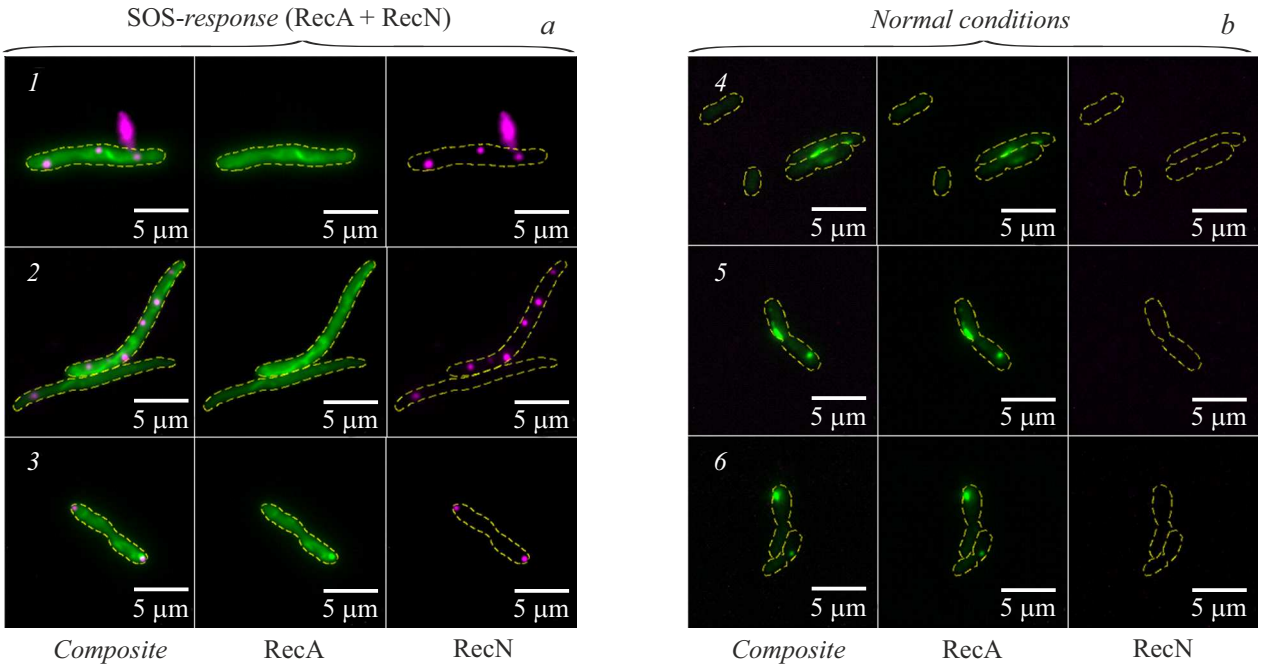


Рис. 1. Визуализация RecA::mNeonGreen (зеленый) и RecN::mScarlet (фиолетовый) с использованием широкопольной микроскопии на агарозном слайде в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа, вызванном введением ципрофлоксацина (*a*), и в нормальных клетках *E. coli* (*b*). Границы клеток обозначены желтыми штриховыми линиями. *1–6* — разные поля одного эксперимента, содержащие клетки. Цветной вариант рисунков представлен в электронной версии статьи.

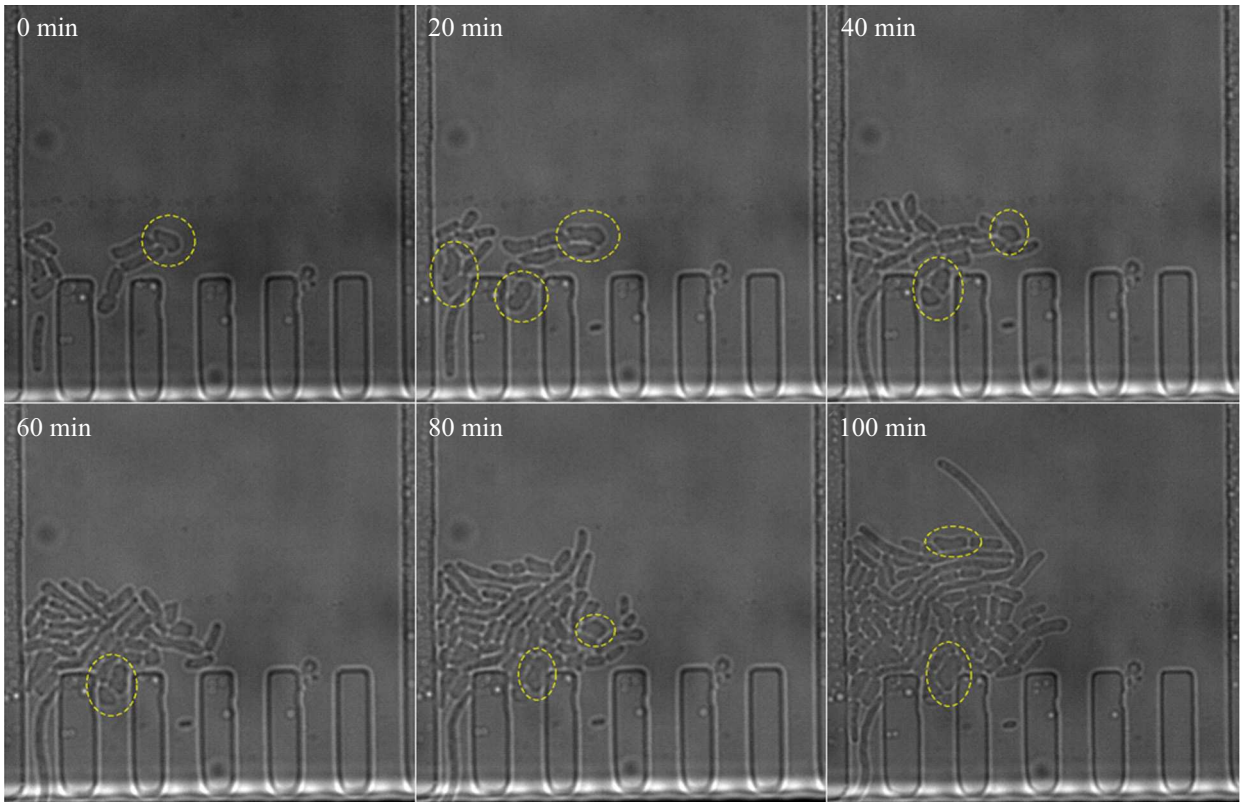


Рис. 2. Визуализация роста клеток модифицированного штамма клеток *E. coli* методом широкопольной микроскопии, съемка в проходящем свете. Желтым контуром обозначены деформированные клетки.

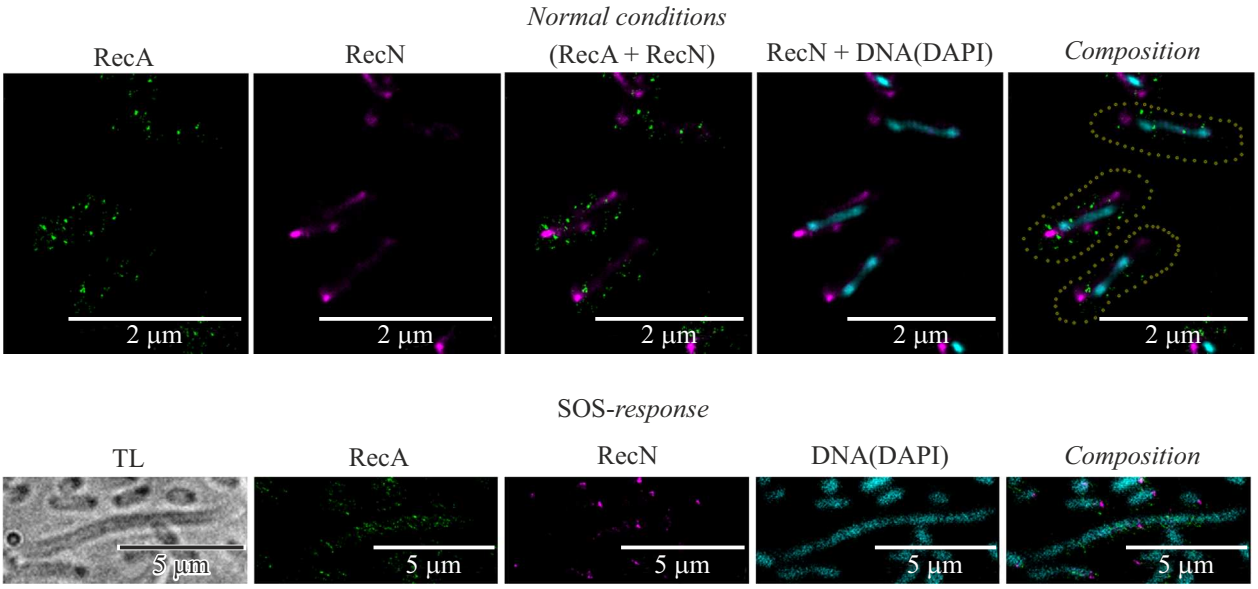


Рис. 3. Визуализация RecA::mNeonGreen (зеленый), RecN::mScarlet (фиолетовый), ДНК (голубой) и их взаимной локализации с использованием локализационной микроскопии с окрашиванием антителами к mNeonGreen в нормальных клетках *E. coli* (верхний ряд) и в клетках *E. coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа, вызванном облучением ультрафиолетом (нижний ряд).

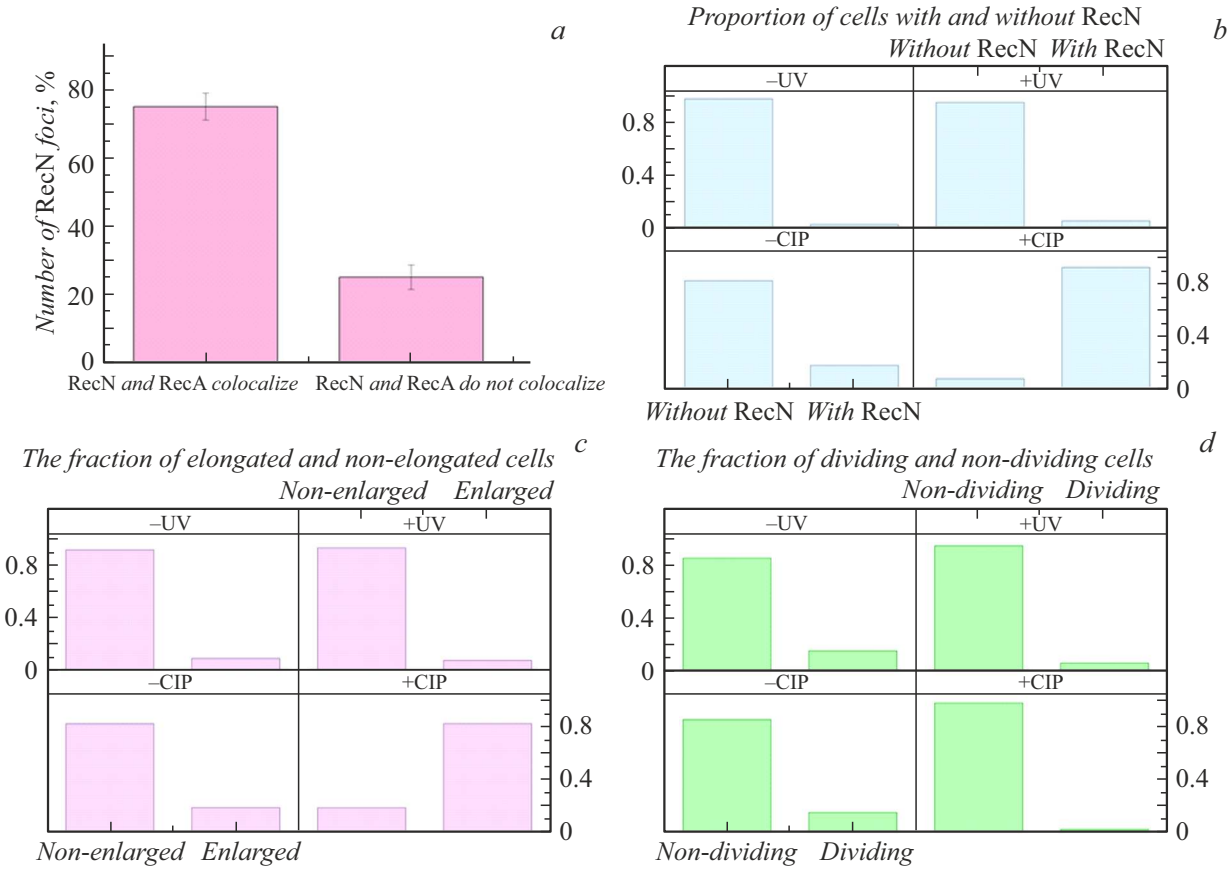


Рис. 4. Статистические данные, касающиеся колокализации RecN и RecA (*a*), доли клеток с фокусами RecN (*b*), доли удлиненных (*c*) и делящихся (*d*) клеток при индукции SOS-ответа воздействием ультрафиолета и ципрофлоксацина.

Оценку активации SOS-ответа производили по следующим параметрам: 1) общему количеству клеток; 2) количеству делящихся клеток, имеющих поперечную перетяжку (рис. 4, *d*); 3) количеству клеток длиной бо-

лее $6\,\mu$m (рис. 4, *c*); 4) доле клеток с RecN (рис. 4, *b*). При использовании ультрафиолета общее количество клеток меньше контроля в 1.5 раза, количество удлиненных клеток остается на уровне контроля, однако процент делящихся клеток снижается в 2.8 раза. Количество видимых фокусов RecN увеличивается в сравнении с контролем в 1.5 раза, тем не менее процент клеток с RecN остается низким (4.91 % при индуцировании). Другая ситуация имеет место при использовании ципрофлоксацина. Количество клеток в контрольном образце больше количества обработанных антибиотиком клеток в 1.84 раза. Процент делящихся клеток падает в 7 раз, а количество удлиненных клеток возрастает в 4.5 раза. Процент клеток с RecN возрастает с 17.73 до 92.36 %. В эксперименте с применением ципрофлоксацина контроль показал больший процент удлиненных клеток в сравнении с контролем при применении ультрафиолета. Это объясняется тем, что клетки для этих экспериментов культивировали на разных питательных средах. При культивировании на среде LB клетки могут самопроизвольно входить в состояние SOS-ответа чаще, чего не происходит на среде M9.

Таким образом, в результате экспериментов методами широкопольной и локализационной микроскопии были получены изображения, отражающие взаимное расположение белков RecA, RecN и ДНК в клетках *E. coli*. Широкопольная флуоресцентная микроскопия при нормальных условиях позволяет наблюдать фокусы и филаменты RecA; RecN в этих условиях практически не визуализируется. При SOS-ответе RecN располагается вдоль филаментов RecA или на их концах. Фокусы RecN расположены на полюсах и в средней части бактериальной клетки. Локализационная микроскопия при нормальных условиях позволяет визуализировать кольцеобразные структуры белка RecN, внутри которых локализуется ДНК. Белок RecA при этом находится в виде спиралей, которые обвивают RecN и ДНК. При SOS-ответе же RecN образует фокусы, колокализующиеся с филаментами RecA в 75.26 % случаев.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-00085 (https://rscf.ru/project/24-74-00085/) и при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки РФ (№ FSEG-2026-0009).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] 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

[2] P.P. Cardenas, C. Gándara, J.C. Alonso, DNA Rapair, **14** (1), 1 (2014). DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.12.001

[3] E. Del Val, W. Nasser, H. Abaibou, S. Reverchon, Sci. Rep., **11**, 21106 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-00589-9

[4] B. Gao, L. Liang, L. Su, A. Wen, C. Zhou, Y. Feng, PNAS, **120** (2), e2217493120 (2023). DOI: 10.1073/pnas.2217493120

[5] K. Keyamura, T. Hishida, Commun. Biol., **2** (1), 413 (2019). DOI: 10.1038/s42003-019-0655-4

[6] В.А. Нестеренко, В.Д. Рощектаева, Н.Е. Морозова, Письма в ЖТФ, **51** (18), 34 (2025). DOI: 10.61011/PJTF.2025.18.61087.8027 [V.A. Nesterenko, V.D. Roshektaeva, N.E. Morozova, Tech. Phys. Lett., **51** (9), 76 (2025). DOI: 10.61011/TPL.2025.09.61863.8027].

[7] A.D. Vedyaykin, I.E. Vishnyakov, V.S. Polinovskaya, M.A. Khodorkovskii, A.V. Sabantsev, MicrobiologyOpen, **5** (3), 378 (2016). DOI: 10.1002/mbo3.336