

## NADPRODUKČIA A CHARAKTERIZÁCIA UvrA PROTEÍNU KÓDOVANÉHO pGP2 PLAZMIDOM Z *Acetobacter estunensis* GP2

PETER GRONES, SILVIA MINÁRIKOVÁ-VÁVROVÁ, MARTIN BABIČ, ZUZANA ODNOGOVÁ a JOZEF GRONES

Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Mlynská dolina B2-122, 842 15 Bratislava 4  
grones@fns.uniba.sk

Došlo 19.7.11, prepracované 7.10.11, prijaté 13.10.11.

Kľúčové slová: bakteriálny plazmid, *uvrA* gén, exinukleáza A, *Acetobacter*

### Úvod

Baktérie octového kvasenia patria do skupiny nepatogénnych aeróbných mikroorganizmov, ktoré sú schopné premieňať organický substrát na organické kyseliny, ako je kyselina octová, kyselina propiónová, využívajú sa pri syntéze polysacharidu acetánu, pri príprave čistej bakteriálnej celulózy a sú prítomné pri kvasnom procese pri príprave piva, vína a pri produkcii kombuchy. Do čeľade *Acetobacteriaceae* zaraďujeme 10 rodov baktérií, z ktorých najviac členov bolo identifikovaných v dvoch najvýznamnejších rodoch *Acetobacter* a *Gluconobacter*<sup>1</sup>.

Bunky octových baktérií obsahujú širokú paletu extrachromozómových plazmidových DNA s veľkosťou od niekoľko kilobáz až po desiatky kilobáz<sup>2,3</sup>. Plazmidy spravidla kódujú proteíny podieľajúce sa na replikácii plazmidu, ako aj niektoré proteíny zabezpečujúce fenotypovú výhodu pre bunku<sup>4-7</sup>.

Jedným z najdôležitejších mechanizmov v organizmoch je mechanizmus reparácie DNA po pôsobení vonkajších environmentálnych vplyvov. Pôsobením UV žiarenia dochádza neustále k poškodeniu DNA v bunke, a vzniknuté DNA lézie<sup>8,9</sup> sú po excízii reparačným mechanizmom bunky opravené<sup>10</sup>. Nukleotidová excízna reparácia (NER) riadená UvrABC typom proteínov sa uskutočňuje v bakteriálnych bunkách a archeách, ale tieto proteíny sa nepodieľajú pri excízii v eukaryotických bunkách<sup>11</sup>. Na procese NER sa podieľajú UvrABC proteíny kódované tromi génmi *uvrA*, *uvrB* a *uvrC*, pričom iba prvé dva sú kontrolované SOS mechanizmom bunky<sup>12</sup>. Pri indukcii dochádza k zvýšeniu počtu kópií UvrA proteínu desaťnásobne na 200–250 kópií na bunku, pričom UvrB proteínu je okolo 1000 kópií na bunku<sup>13</sup>. V súčasnosti je známych viac ako 200 sekvencií *uvrA* génu, 70 sekvencií *uvrB* génu

a 80 sekvencií *uvrC* génu. Pri reparácii dimér UvrA proteínu rozpoznáva poškodené miesto a spolu s UvrB proteínom sa podieľa na DNA reparácii.

Bakteriálny *uvrA* gén kóduje proteín (103–105 kDa), u ktorého boli na primárnej štruktúre identifikované dva motívy zinkových prstov a dve ATP väzbové ATPázové kazetové (ABC ATPáza) domény<sup>14,15</sup>. Samotný proteín obsahuje dve domény oddelené flexibilnou oblasťou senzitivnou na proteázy. Na N- a C-terminálnom konci obidvoch domén je po jednej z ABC ATPázových domén prerušenej regulačnou oblasťou, zinkovými prstami.

Z buniek octových baktérií rodu *Acetobacter estunensis* GP2 sme izolovali plazmid pGP2, ktorý kóduje *uvrA* gén, ktorého klonovanie do expresného vektora a nadprodukcia proteínu excinukleázy A je cieľom predloženej práce.

### Materiál a metódy

#### Bakteriálne kmene a kultivačné podmienky

Na izoláciu plazmidov a pri klonovaní génov sa využili kmeň *Escherichia coli* XL1 Blue [*endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>Δ</sup>(lacZ)M15] hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)] (Stratagene) a pri nadprodukcii proteínu kmeň *Escherichia coli* BL21 (DE3) [*F-ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ*(DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene1 ind1 sam7 nin5*]). Plazmid pGP2 izolovaný z buniek *Acetobacter estunensis* GP2 sa použil na amplifikáciu *uvrA* génu. Bunky *Acetobacter* sa kultivovali na YPG médium (5% kvasničný autolyzát, 3% peptón a 1% manitol) a bunky *E. coli* na Luria-Bertani (LB) médiu (10% tryptón, 5% kvasničný autolyzát a 5% NaCl, pH 7,4). Do kultivačných médií sa pridával kanamycín do výslednej koncentrácie 50 μg ml<sup>-1</sup> a ampicilín do koncentrácie 100 μg ml<sup>-1</sup>.*

#### Biochemikálie

Jednotlivé zložky pre PCR reakciu a priméry sú produktami Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Bakteriálny vektor pGEM-T Easy (ampicilín<sup>R</sup>; Promega, Madison, WI, USA), expresný vektor pET-28a- (T7 promótor, kanamycín<sup>R</sup>; Novagen, Madison, WI, USA), sa využil pri klonovaní a expresii *uvrA* génu. Restriktčné endonukleázy, izopropylthio-β-D-galaktopyranozid (IPTG), X-gal, T4 DNA ligáza sú produkty BioLabs a proteínový štandard pre SDS-PAGE elektroforéze sú produkty Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

#### PCR amplifikácia

Pre PCR amplifikáciu exinukleázy A sa navrhli priméry ku génu na základe sekvencie plazmidu pGP2. Reakčné zmesi a oligonukleotidové priméry sú produktom Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). PCR amplifikácia sa uskutočnila v 25 μl reakčnej zmesi podľa protokolu pre HotStar Taq DNA polymerázu (Fermentas)

v termocykleri GeneAmp PCR System 9700 (AB Applied Biosystems USA). PCR reakcia prebehla za nasledovných podmienok: pre-denaturácia 5 min pri 94 °C, 30 cyklov: pri 94 °C 1,5 min, 55 °C 1 min, a 72 °C 1 min so záverečnou 8 min polymerizáciou pri 72 °C.

#### Klonovanie *uvrA* génu

Gén *uvrA* kódovaný plazmidom pGP2 z *A. estunensis* sa amplifikoval využitím PG1 priméru 5'- GGA TCC ATG TAC GTG CTG GAC GAG -3 a PG2 priméru 5'- AAG CTT TTA CAG CAT CGG CTT AAG G -3'. 1298 bp produkt sa klonoval do pGEM-T Easy vektora a ligačnou zmesou sa transformovali bunky *E. coli* XL1. Ampicilín rezistentný konštrukt pGEM-*uvrA* sa sekvenoval dideoxy terminačnou metódou podľa Sanger<sup>16</sup> a produkt sa delil na ABI Prism 3200 automatickom DNA sekvenátore (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Na analýzu nukleotidových sekvencií sa využil program<sup>17</sup> BLAST-Basic (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

BamHI-HindIII fragment plazmidu pGEM-*uvrA* sa klonoval do pET-28a- expresného vektora a transformoval bunky *E. coli* XL1. Nový vektor pET-*uvrA* okrem *uvrA* génu obsahuje aj vodiacu sekvenciu 32 aminokyselín (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGEEEMGR), na N-terminálnom konci so šiestimi histidínmi pre purifikáciu afinitnou chromatografiou. Expresným vektorom pET-*uvrA* sa transformovali bunky *E. coli* BL21 (DE3) a po selekcii pozitívne transformanty sa využili na nadprodukcii proteínu.

#### Nadprodukcia a purifikácia rekombinantnej exinukleázy A

100 ml tekutého LB média s 50 µg ml<sup>-1</sup> kanamycinu sme inokulovali 100 µl nočnej kultúry *E. coli* BL21 (DE) s pGEM-*uvrA*. Kultúru sme nechali rásť na trepačke pri 37 °C do optickej hustoty A<sub>590</sub> = 0,6 a následne indukovali 0,5 mmol l<sup>-1</sup> IPTG. Po indukcii bunky rástli dve hodiny za neustáleho trepania. Po kultivácii sa bunky usadili 10minútovou centrifugáciou 8000 g pri teplote 4 °C. Sediment sa suspendoval v homogenizačnom roztoku A (25 mmol l<sup>-1</sup> Tris.HCl pH 8,0, 50 mmol l<sup>-1</sup> NaCl, 10% glycerol, 0,1 mmol l<sup>-1</sup> PMSF) a bunky sa homogenizovali ultrazvukom pri teplote 4 °C. Homogenát sa centrifugoval 10 min pri 16 000 g pri teplote 4 °C. Nukleové kyseliny z homogenátu sa odstránili prezrážaním s 1% streptomycín sulfátom (Serva) a po hodine inkubácie v ľadovom kúpeli za stáleho miešania sa zrazenina usadila centrifugáciou. Supernatant sa využil na purifikáciu exinukleázy A HPLC afinitnou chromatografiou (Dionex, UltiMate 3000 LC system, Atlanta, GA, USA) na ProPac ImaC 10 na kolóne (Dionex) ekvilibrovanej s PN tlmivým roztokom (50 mmol l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>fosfátový tlmivý roztok pH 8,0, 300 mmol l<sup>-1</sup> NaCl) s 10 mmol l<sup>-1</sup> imidazolom. Na kolóne nenaviazaný proteín sa odmyl ekvilibračným tlmivým roztokom s 5 mmol l<sup>-1</sup>, 10 mmol l<sup>-1</sup> a 20 mmol l<sup>-1</sup> imidazolom a následne rekombinantný proteín eluovali gradientom 30

až 500 mmol l<sup>-1</sup> imidazolom v tlmivom roztoku PN. Izolovaný proteín sme dialyzovali oproti TNP tlmivému roztoku (50 mmol l<sup>-1</sup> Tris.HCl pH 8,0, 50 mmol l<sup>-1</sup> NaCl a 0,1 mmol l<sup>-1</sup> PMSF) a následne proti TNP s 50% glycerolom. Homogenita proteínu sa preverila elektroforézou v 12% PAGE (cit.<sup>18</sup>), kde sa proteíny vyzualizovali farbením s Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories) v 20% kyseline octovej a 40% metanole. Purifikovaný proteín sa uchovával pri -80 °C. Koncentrácia proteínu sa určila meraním UV absorpcie pri 280 nm (Spektrofotometer ND-1000 UV-Vis, NanoDrop Technologies) a činidlom podľa Bradfordové<sup>19</sup>. Ako štandard sa použilo BSA (Sigma).

#### Bioinformatická analýza

Na premenu nukleotidovej sekvencie na aminokyselinovú a jej analýze sa využil program ExPASy SwissProt Web server (<http://www.expasy.ch>). Na porovnanie aminokyselinovej sekvencie s príbuznými sekvenciami v databáze sa využil program<sup>20</sup> ClustalW. Na identifikáciu sekundárnej štruktúry proteínu sa využili Jpred (cit.<sup>21</sup>), PHD (cit.<sup>22</sup>), PSIPRED (cit.<sup>23</sup>) a SSpro 23 (cit.<sup>24</sup>) program. CLC Main Workbench a TAM T08 sme využili na analýzu proteínových motívov a terciárnej štruktúry proteínu<sup>25</sup>.

#### Stanovenie ATPázovej aktivity

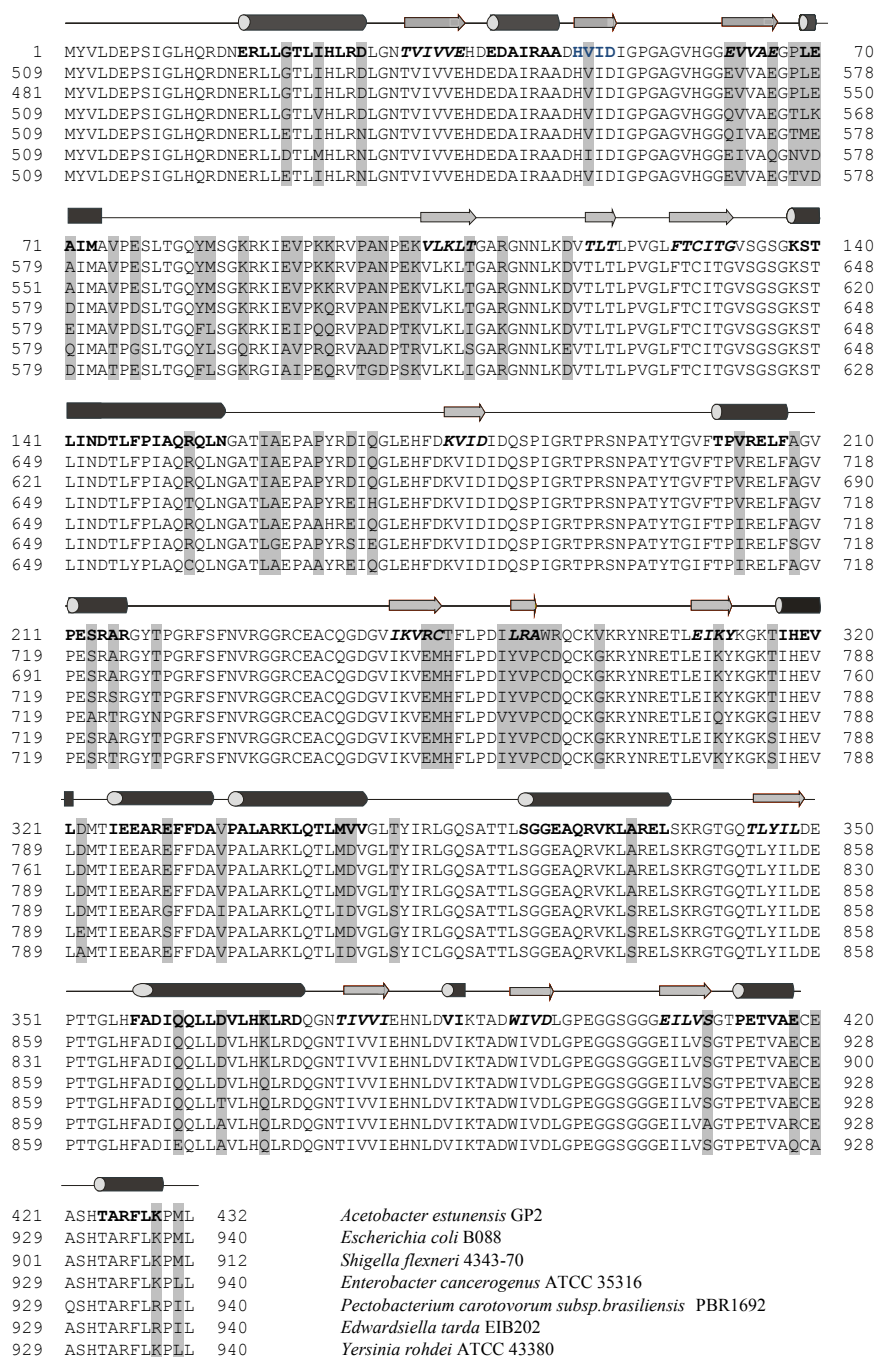
ATPázová aktivita sa stanovila využitím neradioaktívnej metódy<sup>26</sup>, kde interaguje voľný anorganický fosfát s čerstvo pripraveným 0,045% (w/v) roztokom malachitovej zelenej a 4,2% (w/v) roztokom molibdénu amónneho v 4 mol l<sup>-1</sup> HCl zmiešanom v pomere 3:1. 50 µl reakčnej zmesi (1 µg proteín, 50 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 7,9; 5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> a 1 mmol l<sup>-1</sup> ATP) sa inkubuje 0, 5, 10, 15, 20, 25 a 30 min pri teplote 37 °C. Po inkubácii pridáme 800 µl malachit-molibdénového roztoku a po 1 min 100 µl 34% (v/v) citranu sodného a následne meriame zmenu absorpcie pri 660 nm. Na porovnanie ATPázovej aktivity sme ako štandard použili Rep34 proteín plazmidu pGP2 (cit.<sup>27</sup>). Na výpočet množstva uvoľneného fosfátu ako štandard sme použili rôznu koncentráciu Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

#### Výsledky a diskusia

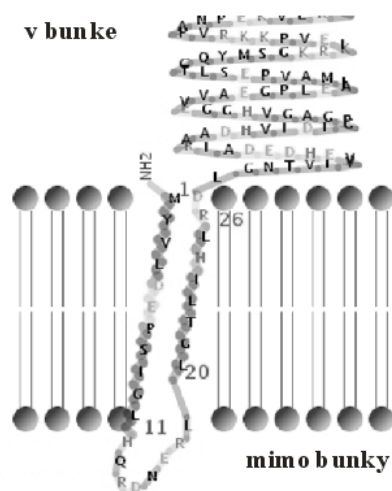
V bakteriách *Acetobacter estunensis* GP2 sa identifikoval plazmid pGP2 (cit.<sup>7</sup>) (2797 bp), ktorý kóduje okrem génu pre replikačný proteín aj 1298 bp veľký *uvrA* gén pre A podjednotku exinukleázy. Bioinformatickou analýzou a porovnaním s inými génmi pre exinukleázu A sme potvrdili, že primárna štruktúra exinukleázy A z pGP2 má 98% identitu s podobným proteínom z *E. coli* B088 (ZP\_06664771.1), 98% identitu s excinukleázou ABC a A podjednotkou z *E. coli* MS 196-1 (ZP\_07183396.1), 94% identitu s excinukleázou ABC a jej podjednotkou z *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 (ZP\_05969383.1),

88% identitu s excinukleázou ABC s A podjednotkou z *Pectobacterium carotovorum* (ZP\_03826093.1), 88% identitu s excinukleázou ABC A podjednotkou z *Edwardsiella tarda* EIB202 a s UvrABC proteínom A z *Yersinia rohdei* ATCC 43380 (ZP\_04613627.1) (obr. 1).

Bioinformatickou analýzou aminokyselinovej sekvencie 432 aminokyselín veľkého proteínu sa identifikovalo 13 veľkých viac ako 4 aminokyseliny dlhých alfa helixov a 14 veľkých viac ako 4 aminokyseliny dlhých beta štruktúr a dve domény ABC transportéra (v pozícií 1–55 amino-



Obr. 1. Porovnanie aminokyselinovej sekvencie plazmidom pGP2 kódovanou excinukleázou ABC A pojednotky s proteínmi charakterizovanými z génov na chromozóme vybraných druhov baktérií. Valčekom a šipkou je vyznačená  $\alpha$  a  $\beta$  sekundárna štruktúra (●  $\alpha$ -helix a  $\rightarrow$   $\beta$ -štruktúra, sivou farbou sú vyznačené odlišnosti v sekvencii)

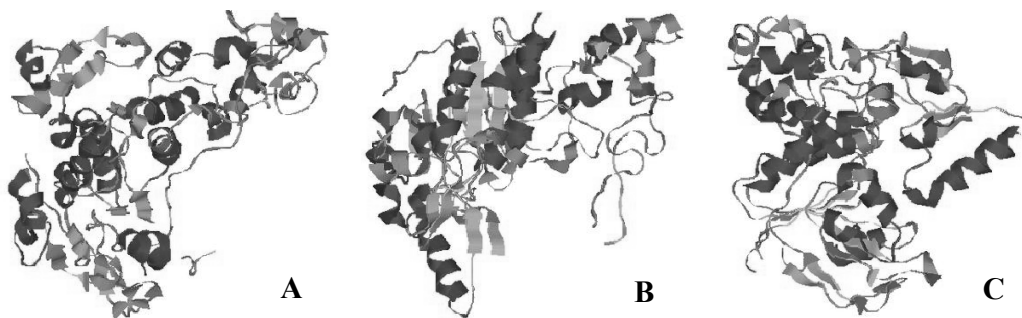


Obr. 2. Umiestnenie transmembránovej domény excinukleázy A kódovanej plazmidom pGP2 z buniek *Acetobacter estunensis* GP2 v bakteriálnej bunkovej membráne

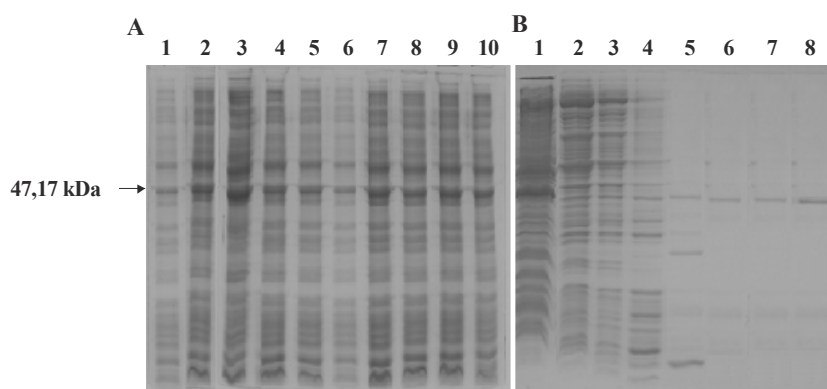
kyselina, 125–400 aminokyselina) a GTP-ázová doména (v pozícií 126–143 aminokyselina). Využitím CLC Protein Workbench 5.2 programu sa identifikovala transmembránová doména, lokalizovaná v pozícií 118–138 aminokyseliny na *N*-terminálnom konci (VTLTLPVGLFTCITGVSGSGK) (obr. 2). Na dizajnovanie terciárnej štruktúry proteínu sa využil SAM-T08 program<sup>25</sup> (obr. 3). Teoretický izoelektrický bod excinukleázy A podjednotky je pI 6,8.

#### Konštrukcia rekombinantného plazmidu

Plazmid pGP2 sa využil ako templát pre PCR amplifikáciu *uvrA* génu využitím primérov PG1 a PG2. Po amplifikácii sa PCR produkt klonoval do vektora pGEM T-easy a transformanty v bunkách *E. coli* XL1 Blue sa selektovali na LB médiu s ampicilínom, Xgal a IPTG. Z pripraveného rekombinantu pGEM-*uvrA* (4,4 kb) sa s BamHI a HindIII fragment génu vyštiepil a klonoval do BamHI-HindIII miesta vektora pET28a-. Selekcii rekombinantov v bunkách *E. coli* XL1 Blue na LB médiu



Obr. 3. Terciárna štruktúra excinukleázy A domény kódovanej na plazmidu pGP2 z buniek *Acetobacter estunensis* GP2 (vizualizácia z troch strán modelovanej proteinovej štruktúry; A – pohľad z predu, B – pohľad z vrchu, C – pohľad z boku)



Obr. 4. Nadprodukcia a purifikácia excinukleázy A kódovanej *uvrA* génom z plazmidu pGP2 analyzovaná na 12 % SDS-PAGE: (A) dráha 1. a 6. celkové bunkové proteíny pred indukciou s IPTG; dráhy 2–5, celkové bunkové proteíny v čase 0,5, 1, 1,5 a 2 h po indukcii s IPTG (0,4 mmol l<sup>-1</sup> IPTG pri 37 °C); dráhy 7–10. celkové bunkové proteíny v čase 0,5, 1, 1,5 a 2 h po indukcii s IPTG (0,4 mmol l<sup>-1</sup> IPTG pri 30 °C). (B) dráha 1, exprimovaný proteín homogenate pred purifikáciou, dráhy 2, 3, 4 premývanie kolóny s 5 mmol l<sup>-1</sup>, 10 mmol l<sup>-1</sup> a 20 mmol l<sup>-1</sup> imidazolom, dráhy 5–8 rekombinantný proteín excinukleáza A po HPLC purifikácii eluovaná gradientom 30–500 mmol l<sup>-1</sup> imidazolom. Excinukleáza A je naznačená šípkou (47,17 kDa)

## Tabuľka I

Purifikácia UvrA proteínu po expresii v bunkách *Escherichia coli*<sup>a</sup>

	Objem [ml]	Proteín [mg]	Koncentrácia proteínu [mg ml <sup>-1</sup> ]	Výťažok [%]	Stupeň purifikácie
Bunkový lyzát	8	311	38,9	100	1
Streptomycín sulfát	7,5	285	38	97,6	1,19
Ni-Afinitná chromatografia	0,95	6,3	6,69	17,2	49,4

<sup>a</sup>Vychádzali sme z 0,6 g buniek *E. coli* BL21

s kanamicínom sa pozitívnym rekombinantom pET28a-*uvrA* (6,8 kb) transformovali bunky *E. coli* BL21 (DE3).

Plazmid pET28-*uvrA* sme využili na nadprodukciiu proteínu exinukleázy A. Rozrastené bunky na tekutom LB médiu s kanamycínom pri  $A_{590}$  s hodnotou 0,5 sa indukovali 0,4 mmol l<sup>-1</sup> IPTG. Sledovali sme úroveň expresie v časových intervaloch 30 min, 60 min, 90 min a 120 min pri teplote 30 °C a 37 °C (obr. 4A). Po optimalizácii nadprodukciiu proteínu sme bunky kultivovali v 100 ml LB média s kanamycínom, ktoré sme inokulovali 0,1 ml nočnej kultúry a inkubovali na rotačnej vodnej trepačke pri teplote 37 °C do absorbancie  $A_{590} = 0,5$  a následne indukovali 0,4 mmol l<sup>-1</sup> IPTG dve hodiny. Bunky sme po usadení centrifugáciou suspendovali v tlmivom roztoku A a homogenizovali ultrazvukom.

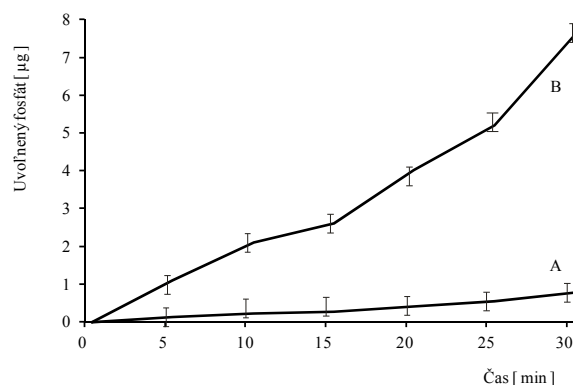
Nadprodukovaná exinukleáza A (47,17 kDa) sa purifikovala HPLC afinitnou chromatografiou na Ni-NTA kolóne (obr. 4B) a po purifikácii sa proteín dialyzoval proti tlmivému roztoku TNP s 50% glycerolom a uchovával sa pri -70 °C. Zo 100 ml indukovaných buniek sme izolovali 6,3 mg čistej exinukleázy A (tabuľka I).

## Stanovenie ATP-ázovej aktivity exinukleázy A

Z bioinformatickej analýzy vyplývalo, že jedna z domén exinukleázy A má ABC transportérovú doménu s ATP väzbovou kazetou. Využitím štandardnej metódy popísanej Lanzettom a spol.<sup>25</sup> sme stanovovali ATP-ázovu aktivitu proteínu (obr. 5). Aktivitu sme porovnali s ATP-ázovou aktivitou replikačného proteínu plazmidu pGP2, ktorá je však takmer desaťkrát nižšia ako u Rep34 replikačného proteínu<sup>27</sup> a podobná ako bola nameraná v iných bakteriálnych bunkách<sup>14,15</sup>.

## Záver

Gény kódované plazmidmi, ktorých úlohou nie je podieľať sa na replikácii plazmidu, vytvárajú pre bunku fenotypovú výhodu oproti baktériám bez plazmidu, alebo dopĺňajú genetickú výbavu bunky. Medzi takéto proteíny by sa mohla zaradiť aj exinukleáza A ako jeden z reparačných enzýmov. Nadprodukcia a purifikácia exinukleázy A



Obr. 5. Stanovovanie ATP-ázovej aktivity A) exinukleáza A a B) Rep34 proteínu z plazmidu pGP2 z *Acetobacter estunensis* GP2

kódovanej plazmidom pGP2 z *A. estunensis* je úvodnou štúdiou zameranou na reparačné mechanizmy v bunkách octových baktérií. Zámerom je štúdium podieľu UvrA proteínu kódovaného plazmidom k samotnej reparácii v materských bunkách octových baktérií ako aj štúdiom terciárnej štruktúry proteínu.

## LITERATÚRA

1. Thomas C. M.: *The Horizontal Gene Pool: Bacterial Plasmids and Gene Spread*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam 2000.
2. Fukaya M., Takemura H., Okumura H., Kawamura Y., Horinouchi S., Beppu T.: *J. Bacteriol.* 172, 2096 (1990).
3. Fujiwara M., Fukushi K., Takai M., Hayashi J., Fukaya M., Okumura H., Kawamura Y.: *Biotechnol. Lett.* 14, 593 (1992).
4. Grones J., Škereňová M., Bederková K., Turňa J.: *Biologia* 44, 1181 (1989).
5. Grones J., Kráľová A., Turňa J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 26 (1993).
6. Fomenkov A., Xiao J., Xu S.: *Gene* 158, 143 (1995).
7. Grones P., Grones J.: *Biologia* 66, 221 (2011).
8. Setlow R. B., Carrier W. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A. 51, 226 (1964).
9. Boyce R. P., Howard-Flanders P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51, 293 (1964).
  10. Pettijohn D., Hanawalt P.: J. Mol. Biol. 93, 395 (1964).
  11. Van Houten B., Croteau D. L., Vecchia M. J. D., Wang H., Kisker C.: Mut. Res. 577, 92 (2005).
  12. Janion C.: Acta Biochim. Pol. 48, 599 (2001).
  13. Van Houten B.: Microbiol. Rev. 54, 18 (1990).
  14. Husain I., Van Houten B., Thomas D. C., Sancar A.: J. Biol. Chem. 261, 4895 (1986).
  15. Doolittle R. F., Johnson M. S., Husain I., Van Houten B., Thomas D. C., Sancar A.: Nature 323, 451 (1986).
  16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977).
  17. Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J.: Nucl. Acids Res. 25, 3389 (1997).
  18. Laemmli U. K.: Nature 227, 680 (1970).
  19. Bradford M. M.: Anal. Biochem. 72, 248 (1976).
  20. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J.: Nucleic Acids Res. 22, 4673 (1994).
  21. Cuff J. A., Clamp M. E., Siddiqui A. S., Finlay M., Barton G. J.: Bioinformatics 14, 892 (1998).
  22. Rost B., Yachdav G., Liu J.: Nucleic Acids Res. 32, W321 (2004).
  23. Bryson K., McGuffin L. J., Marsden R. L., Ward J. J., Sodhi J. S., Jones D. T.: Nucleic Acids Res. 33, W36 (2005).
  24. Cheng J., Randall A., Sweredoski M., Baldi P.: Nucleic Acids Res. 33, W72 (2005).
  25. Katzman S., Barrett C., Thiltgen G., Karchin R., Karplus K.: Bioinformatics 24, 2453 (2008).
  26. Lanzetta P. A., Alvarez L. J., Reinach P. S., Candia O. A.: Anal. Biochem. 100, 95 (1979).
  27. Grones P., Grones J.: Adv. Biosci. Biotechnol. 1, 417 (2010).

**P. Grones, S. Mináriková-Vávrová, M. Babič, Z. Odnogová, and J. Grones** (*Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava*): **Overproduction and Characterization of UvrA Protein Encoded by Plasmid from *Acetobacter estunensis* GP2**

Plasmid pGP2 from *Acetobacter estunensis* GP2 encodes 1 296 bp *uvrA* gene for 432 aa repair protein exonuclease A. Bioinformatic analysis of the protein confirmed 13  $\alpha$ -helices and 14  $\beta$ -structures, two domains of ABC transporters, one GTPase domain and a 21-amino-acid large trans-membrane domain. The protein has 98–88 % identities with some bacterial genome-encoded proteins. *uvrA* gene amplified by PCR was cloned in pET28a- expression vector and purified by HPLC affinity chromatography. The purified protein (47.17 kDa) shows the ATPase activity ten times lower than the Rep34 protein (isoelectric point 6.8) from plasmid pGP2.