

А.А.Горяев, Е.Ю.Щелканова, Ю.В.Лозовский, И.В.Тучков, Н.И.Смирнова

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР ГИПЕРПРОДУЦЕНТА ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА II ТИПА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ЭТОГО БЕЛКА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Показано, что внедрение транспозона Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) в хромосому токсигенного штамма *V. cholerae* MAK757 биовара эльтор обусловило появление инсерционных мутантов с измененным геномом профага СТХф. Реорганизация генома профага выразилась в делеции четырех генов *zot*, *ace*, *cep*, *orfU* при сохранении лишь оперона *ctxAB*, кодирующего синтез холерного токсина II типа. Указанное изменение генома профага СТХф обусловило повышение продукции этого белка у клонов MAK757 chr.:Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) Tox<sup>++</sup> более чем в 2000 раз. Среди инсерционных мутантов Km<sup>R</sup> Tox<sup>++</sup> в качестве штамма-продуцента выбран один клон с наиболее высоким уровнем биосинтеза холерного токсина (42,0–45,0 мкг/мл), получивший обозначение KM234. Подобраны условия для культивирования штамма KM234, обеспечивающие наибольшую продукцию холерного токсина. Показано, что сконструированный штамм *V. cholerae* KM234 биовара эльтор является стабильным и эффективным продуцентом холерного токсина 2-го типа и может быть использован в производстве для получения этого белка, необходимого для приготовления холерных профилактических и диагностических препаратов.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, штамм-продуцент холерного токсина, реорганизация генома профага СТХф, транспозон Tn5-Mob.

Реальная возможность завоза холеры эльтор на территорию Российской Федерации из стран Азии и Африки, где сохраняется неблагоприятная эпидемиологическая ситуация, указывает на необходимость создания эффективных диагностических и профилактических препаратов. Один из подходов к решению этой задачи состоит в разработке нового поколения иммунодиагностических тест-систем и химических холерных вакцин, важным компонентом которых является иммуногенная В-субъединица холерного токсина (ХТ) II типа, который продуцируют эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* биовара эльтор. В этой связи очевидна необходимость создания эффективных штаммов-продуцентов ХТ, который является не только ключевым фактором патогенности возбудителя холеры, но и основным протективным антигеном. При решении этой задачи наиболее часто используют рекомбинантные плазмиды с клонированным опероном *ctxAB*, кодирующим ХТ, которые вводят в клетки вирулентных штаммов, несущих резидентные хромосомные гены *ctxAB*. За счет повышения копияности структурных генов *ctxAB* в клетках таких штаммов происходит увеличение продукции ими ХТ. Однако при отсутствии селективного давления стабильность наследования рекомбинантных плазмид клетками таких штаммов, как правило, не превышает 60–80 %, что, в свою очередь, ведет к снижению синтеза ХТ. Поэтому для конструирования стабильных бесплазмидных штаммов-продуцентов мы использовали другой подход, основанный на способности различных транспозонов при внедрении в бактериальный геном вызывать вторичные перестройки в участках ДНК, прилежащих к сайту их интеграции, которые в ряде случаев повышают экспрессию соседних генов.

Целью нашей работы явилось создание безплазмидного штамма *V. cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа с помощью транспозона Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) и определение оптимальных условий для эффективной экспрессии генов *ctxAB*, кодирующих синтез этого белка.

### Материалы и методы

В работе использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* MAK757 биовара эльтор и *V. cholerae* 569В классического биовара, полученные из ГКПБ «Микроб», а также штамм *Escherichia coli* S17-1 (pSUP5011) Km<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup>, предоставленный ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи. Культивирование бактерий проводили в бульоне и агаре LB, а также в казеиновом, АК1 и казеиновом бульонах. Минимальной средой служил глюкозо-солевой агар и глюкозо-солевой раствор [1]. Аминокислоты вносили в концентрациях 20–40 мкг/мл, канамицин – 25 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл, хлорамфеникол – 50 мкг/мл.

Определение продукции холерного токсина проводили с помощью радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на плотной среде [3] и иммуноферментного метода GM<sub>1</sub>ELISA [7].

Конъюгационные скрещивания осуществляли на плотной среде [1]. Для внедрения Tn-элемента в бактериальный геном трансконъюганты MAK757 (pSUP5011) Km<sup>R</sup> Am<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup> выращивали в жидкой минимальной среде с канамицином при 4 °С, поскольку при таких условиях культивирования селективное преимущество получают бесплазмидные клоны, сохранившие Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) в хромосоме. Изолированные колонии, полученные после посева такой культуры на LB агаре с канамицином, прове-

ряли на устойчивость к канамицину, ампицилину и хлорамфениколу, отбирая для дальнейших исследований  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$ -клоны.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее [2], используя для тестирования 6 генов коровой области профага СТХφ, а также Tn5-Mob следующие специфические олигонуклеотидные праймеры:

- ctxA1 (размер ампликона 564)  
 прямой - 5' CgggCAGATTCTAgACCTCCTg';  
 обратный - 5' CgATgATCTTggAgCATCCCCAS 3';
- ctxB1 (размер ампликона 354)  
 прямой - 5' ATgATGAAATGAAAATTTgg 3';  
 обратный - 5' TTAATTTgCCATACTAATGg 3';
- zot1 (размер ампликона 947)  
 прямой - 5' TCgCTTAAcGATggCgCgTTTT 3';  
 обратный - 5' AACCCCGTTTCACTTCTACCCA 3';
- ase1 (размер ампликона 289)  
 прямой - 5' TAAggATgTgCTTATgATggACACC 3';  
 обратный - 5' CCgTgATgAATAAAgATACTCATAgg 3';
- orfU1 (размер ампликона 721)  
 прямой - 5' SAAAATgAgCATggCggC 3';  
 обратный - 5' CCCATTgTgCAATCggTgT 3';
- сер-1 (размер ампликона 162)  
 прямой - 5' CAgAACAATgCCCCACCAC 3';  
 обратный - 5' AAgCACgCTTTCACCTCgggg 3';
- Tn5 Mob-1 (размер ампликона 405)  
 прямой - 5' AgTAgCgTCCTgAACggAACCTTT 3';  
 обратный - 5' AAgAgAACggAgTgAACCCACCAT 3'.

### Результаты и обсуждение

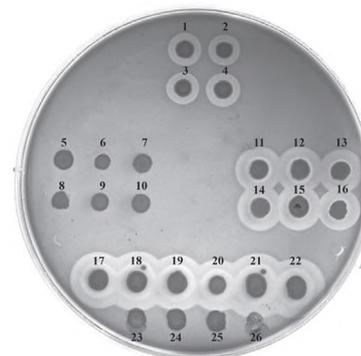
Для проведения транспозонного мутагенеза выбран Tn5-Mob ( $Km^R$ ) на основании его способности, установленной нами ранее [1], с большой частотой внедряться в хромосомную область холерного вибриона вблизи профага СТХφ, несущего структурные гены ctxAB, кодирующие ХТ. В качестве вектора транспозона Tn5-Mob ( $Km^R$ ) использовали конъюгативную плазмиду pSUP5011 ( $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$ ) [6]. Донором плазмиды служил штамм *E.coli* S17-1 (pSUP5011), реципиентом был вирулентный штамм *V. cholerae* MAK757 биовара эльтор, в геноме которого присутствуют две копии генов ctxAB в составе двух профагов СТХφ. Выбор данного реципиента обусловлен отсутствием у него гемолитической активности, что позволяло использовать для определения продукции ХТ у большого количества трансконъюгантов простой и эффективный метод РПИГ на плотной среде. В условиях *in vitro* этот штамм продуцирует в культуральную среду небольшое количество токсина (0,02 мкг/мл по данным ELISA), которое практически недоступно для определения его в РПИГ (рис. 1, колонии 1–10, 23–26).

Частота конъюгационного переноса плазмиды pSUP5011 из *E.coli* S17-1 в клетки *V. cholerae* MAK757 достигала  $5,5 \cdot 10^{-5}$ . Все проверенные трансконъюганты были  $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$ . Последующее культивирование 15 произвольно отобранных клонов

МАК757 (pSUP5011)  $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$  при 4 °С в минимальной среде с добавлением канамицина позволило выделить 263 клон из 2100 проверенных, которые утратили плазмидные маркеры  $Ap^R$   $Cm^R$ , но сохранили устойчивость к канамицину, определяемую транспозоном. Возникновение клонов  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$  обусловлено транспозицией Tn-элемента из плазмидного генома в хромосому, частота которой составила 12,5 %.

Полученные клоны проверяли на продукцию ХТ методом РПИГ, полагая, что внедрение Tn5-Mob в хромосому *V. cholerae* в ряде случаев может привести к изменению биосинтеза этого белка. В результате среди изученных  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$ -клонов действительно обнаружено 6 клонов MAK757 chr::Tn5-Mob с повышенной продукцией ХТ. Зона иммунного гемолиза вокруг макроколоний таких клонов была около 5,0 мм (рисунок, колонии 17–22), тогда как размер такой зоны вокруг макроколоний высокотоксигенного штамма *V. cholerae* 569В не превышали 2–3 мм (рисунок, колонии 1–4). Явная гиперпродукция ХТ клонами MAK757 chr::Tn5-Mob позволила обозначить их фенотип  $Km^R$  Tox<sup>++</sup>. По данным иммуноферментного метода GM1 ELISA, выявленные клоны  $Km^R$  Tox<sup>++</sup> при культивировании их в стандартных лабораторных условиях (казаминовый бульон, pH 7,6, 30 °С) продуцировали 42–45 мкг/мл этого белка (табл. 1). Клон с наибольшей продукцией ХТ был выбран в качестве штамма-продуцента и получил обозначение *V. cholerae* KM234 биовара эльтор.

Повышение более чем в 2000 раз продукции ХТ в клетках ряда клонов, содержащих в геноме транспозон Tn5-Mob, по сравнению с исходным штаммом, указывает на значительное увеличение экспрессии их структурных генов ctxAB. Одним из возможных объяснений изменения продукции ХТ могла быть реорганизация профага СТХφ, индуцированная транспозоном Tn5-Mob. Для подтверждения этого предпо-



Продукция холерного токсина штаммами *V. cholerae* MAK757 chr::Tn5-Mob  $Km^R$ , Tox<sup>++</sup> биовара эльтор, определенная с помощью реакции пассивного иммунного гемолиза:

- 1–4 и 11–16 – высокотоксигенные штаммы *V. cholerae* 569В и Дакка 35 классического биовара, взятые в качестве положительного контроля;
- 5–10, 23–26 – *V. cholerae* MAK757 (исходный);
- 17–19 и 20–22 – независимо полученные инсерционные мутанты *V. cholerae* MAK757 chr::Tn5-Mob  $Km^R$  с повышенной продукцией ХТ

Результаты изучения структуры генома профага СТХφ исходного штамма *V. cholerae* МАК757 биовара эльтор и его инсерционных мутантов с помощью ПЦР

| Штамм  | Продукция токсина по методу |                 | Tn5-Mob | Тестируемые гены профага СТХφ |      |     |     |      |      |
|--|-----------------------------|-----------------|---------|-------------------------------|------|-----|-----|------|------|
|  | РПИГ*, мм                   | ELISA**, мкг/мл |         | cep                           | orfU | ace | zot | ctxA | ctxB |
| МАК757   | 0                           | 0,02            | –       | +                             | +    | +   | +   | +    | +    |
| МАК757 (pSUP5011) Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>                  | 0                           | 0,02            | +       | +                             | +    | +   | +   | +    | +    |
| МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> –<br>транспозант 1-й         | 5                           | 42,2            | +       | –                             | –    | –   | –   | +    | +    |
| МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> –<br>транспозант 2-й         | 5                           | 43,7            | +       | –                             | –    | –   | –   | +    | +    |
| МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> –<br>транспозант 3-й (KM234) | 5                           | 45,0            | +       | –                             | –    | –   | –   | +    | +    |
| 569B   | 2                           | 9,0             | –       | +                             | +    | +   | +   | +    | +    |

\*Размер зоны иммунного гемолиза вокруг макроколоний. \*\*Штаммы выращивали в казеиновом бульоне при 30 °С

ложения мы провели ПЦР-анализ трансконъюгантов МАК757 chr::Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) Tox<sup>++</sup> с целью выявления в их геноме фаговых генов *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep*. Оказалось, что геном их профага СТХφ действительно претерпел значительные изменения, выразившиеся в сохранении генов *ctxA* и *ctxB*, кодирующих ХТ, и потере четырех тестируемых генов, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep*. Повышение продукции холерного токсина у таких инсерционных мутантов, содержащих в хромосоме дефектный или неполный профаг, указывает на еще не описанный механизм регуляции экспрессии генов *ctxAB*, который требует дальнейшего изучения. Такая реорганизация генома профага СТХφ, связанная с делецией указанных генов, вызвана Tn5-Mob, который, видимо, локализован в хромосомной области вблизи СТХφ, поскольку спонтанные мутанты такого типа неизвестны. Тем не менее, независимо от результатов дальнейших исследований в этом направлении, мы получили бесплазмидный

штамм *V. cholerae* биовара эльтор с высоким уровнем продукции ХТ II типа (42,0–45,0 мкг/мл), превышающий таковой у исходного штамма (0,02 мкг/мл) более чем в 2000 раз.

Для определения оптимальных условий, при которых происходит наибольшая продукция ХТ, сконструированный штамм KM234 выращивали на разных питательных средах (АКИ-бульон, LB-бульон, казеиновый) при различных температурах (30 и 37 °С). Выбор названных сред и температурных режимов определялся рядом причин. Во-первых, среда АКИ (1,5 % бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта фирмы «Дифко», 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO<sub>2</sub>) является специально подобранной средой для получения холерного токсина 2-го типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор [5]. Выращивание холерных эльтор вибрионов на этой среде (рН 7,8–8,0) при 37 °С в течение 20 ч обеспечивает эффективный синтез регуляторного белка ToxT, необходимого для выраженной экспрессии структурных генов *ctxAB* [4]. Во-вторых, LB и казеиновый бульон относятся к питательным средам, широко используемым как в лабораторных, так и в производственных условиях при получении ХТ. Полученные данные представлены в табл. 2. В результате проведенных исследований установлено, что эффективный биосинтез ХТ (43,2 мкг/мл по данным GM1 ELISA) наблюдался при выращивании клеток штамма KM234 на казеиновом бульоне при 30 °С. На среде АКИ продукция токсина была также высока, однако она составляла лишь 19,0 мкг/мл. Причина выявленных различий в продукции ХТ штаммом KM234 на среде АКИ (19,0 мкг/мл) и казеиновом бульоне (43,2 мкг/мл) пока неясна. По-видимому, полученный штамм KM234 приобрел способность к ToxT-независимой экспрессии генов *ctxAB* за счет действия нового механизма контроля биосинтеза ХТ, который предстоит изучить.

При выяснении оптимальных условий для биосинтеза ХТ сконструированным штаммом одним из важных является вопрос о стабильности наследования хромосомной мутации, определившей его фенотип Tox<sup>++</sup>. В этой связи у 600 произвольно ото-

Таблица 2

Продукция холерного токсина сконструированным штаммом-продуцентом *V. cholerae* KM234 биовара эльтор при культивировании его на различных средах

| Штамм                          | Используемый бульон               | Температура культивирования, °С | Продукция ХТ по данным GM1 ELISA, мкг/мл |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| 569B*<br>классического биовара | Казеиновый (рН 7,6)               | 30                              | 6,0±0,55                                 |
|                                | Казеиновый (рН 7,6)               | 37                              | 0  |
| KM234<br>биовара эльтор        | LB (рН 6,8)                       | 30                              | 6,5±1,2                                  |
|                                | LB (рН 6,8)                       | 37                              | 13,5±1,0                                 |
|                                | АКИ (рН 8,0)                      | 37                              | 19,0±3,5                                 |
|                                | Казеиновый с 1 % пептона (рН 7,6) | 30                              | 9,0±2,7                                  |
|                                | Казеиновый с 1 % пептона (рН 7,6) | 37                              | 0,7±0,3                                  |
|                                | Казеиновый (рН 7,6)               | 30                              | 43,2±3,0                                 |
|                                | Казеиновый (рН 7,6)               | 37                              | 1,0±0,25                                 |

\* Штамм взят в качестве контроля.

бранных клонов, полученных при расщеплении бульонной культуры (казеиновый бульон, pH 7,6, 30 °С) KM234 на плотной среде без канамицина, проверяли продукцию ХТ с помощью РПИГ. Оказалось, что лишь 5 клонов (или 0,8 %) утратили фенотип *Tox<sup>++</sup>*. Из этого следует, что выявленные условия культивирования штамма 234 (казеиновый бульон, pH 7,6, 30 °С) действительно являются оптимальными для стабильной и эффективной продукции его клетками ХТ.

Таким образом, с помощью транспозона Tn5-Mob (*Km<sup>R</sup>*) сконструирован бесплазмидный штамм *Vibrio cholerae* KM234 биовара эльтор, имеющий высокий и стабильный уровень биосинтеза холерного токсина II типа. Выявление оптимальных условий для продукции ХТ в лабораторных условиях позволяет рекомендовать использование штамма KM234 в производстве для получения и выделения очищенного холерного токсина II типа, который применяется для приготовления холерных иммунодиагностических препаратов. Кроме того, сконструированный штамм может быть использован при проведении генетических исследований с целью изучения нового механизма регуляции экспрессии генов вирулентности и иммуногенности холерных вибрионов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-48310 и РФФИ ОФИ № 06-04-08122.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлева Е.А., Смирнова Н.И. // Мол. генет. – 1991. – № 5. – С. 15–19. – 2. Осин А.В., Нефедов К.С.,

Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 1–10. – 3. Шагинян Б.М., Маракуша Б.И. // Журн. микробиол. – 1983. – № 7. – С. 92–96. – 4. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 7991–7995. – 5. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y. *et al.* // Microbiol. Immunol. – 1986. – Vol. 30 (11). – P. 1075–1083. – 6. Simon R. // Mol. Gen. Genet. – 1984. – Vol. 196. – P. 413–420. – 7. Svennerholm A.-M., Wiklund G. // J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 17. – P. 262–270.

A.A.Goryaev, E.Yu.Shelkanova, Yu.V.Loizovsky, I.V.Touchkov, N.I.Smimova

**Construction of an El Tor Biovariant *Vibrio cholerae* Strain Capable of Type II Cholera Toxin Hyperproduction and Determining the Optimal Conditions for the Production of This Protein**

*Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov*

Introduction of Tn5-Mob (*Km<sup>R</sup>*) transposon into the chromosome of the toxigenic *V. cholerae* strain MAK757 El Tor biovar was shown to result in the emergence of insertion mutants containing an altered genome of CTXφ prophage. The reorganization of the latter was expressed in the deletion of four genes, *zot*, *ace*, *cep*, *orfU*, however, its *ctxAB* operon coding for the synthesis of type II cholera toxin being still retained. This change in the CTXφ prophage has led to as high as 200 fold greater levels of production of this protein by MAK757 clones chr::Tn5-Mob (*Km<sup>R</sup>*) *Tox<sup>++</sup>*. A single clone with the highest cholera toxin biosynthesis levels (42.0–45.0 µg/ml) was selected among the insertion mutants *Km<sup>R</sup> Tox<sup>++</sup>* and designated as KM234. The optimal conditions for culturing the KM234 construct were fitted to provide for the highest cholera toxin elaboration by the cells. The El Tor biovar *V. cholerae* strain KM234 thus constructed was shown to be a stable and efficient type II cholera toxin overproducing strain promising to be applied in the industrial production of this protein routinely used to manufacture the preparations for cholera diagnosis and prophylaxis.

*Key words:* the cholera agent, a cholera toxin hyperproducing strain, prophage CTXφ genome reorganization, Tn5-Mob transposon.

Поступила 10.12.07.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.981.48(471.44)

Л.И.Наркайтис<sup>1</sup>, А.Н.Данилов<sup>2</sup>, Ю.И.Ящечкин<sup>3</sup>, Е.В.Куклев<sup>3</sup>, О.И.Кожанова<sup>2</sup>, М.Е.Минаева<sup>4</sup>, Ю.Ю.Елисеев<sup>1</sup>

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ САРАТОВА КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ С ВОДНЫМ ПУТЕМ ПЕРЕДАЧИ**

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, <sup>3</sup>ФГУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб», <sup>4</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Саратовской области, Саратов

Разработана методика прогнозирования заболеваемости кишечными инфекциями, связанными с водным фактором, в Саратове, основанная на аналитических методах оценки санитарно-гигиенических показателей качества воды централизованного водоснабжения.

*Ключевые слова:* база данных, прогнозирование заболеваемости, статистическая модель, системный подход.

Контроль за качеством питьевой воды в Саратовской области уделяется пристальное внимание, тем не менее, заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ) держится на достаточно высоком уровне. Так, в 2006 г. заболеваемость ОКИ установленной и не установленной этиологии возросла по сравнению с 2005 г. на 20,0 % (с 9366 до

11240 случаев) и превысила аналогичный показатель по области за последние 6 лет [4].

Учитывая вышеизложенное, проведен сбор данных о состоянии хозяйственно-питьевого водоснабжения по санитарно-бактериологическим (8), санитарно-химическим (9) и органолептическим (4) показателям качества воды в 665 точках пяти райо-