

Д.С.Янов, С.Н.Клинова, А.В.Миронин, И.В.Живов, И.П.Погорельский, В.И.Дробков, Ю.Н.Федоров, Я.А.Кибирев

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА К СОЗДАНИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА СУБЪЕДИНИЦЫ В ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», Киров

Представлены результаты экспериментов по конструированию штамма *Escherichia coli* Top10 (pTrcSuB), перспективного для разработки рекомбинантной холерной вакцины для перорального применения. Полученный штамм обладает индуцибельной экспрессией субъединицы В холерного токсина. Изучены особенности экспрессии клонированного гена в штамме-продуценте, а также условия поддержания штамма. Предлагаемый подход позволит получить эффективные и безопасные холерные вакцины.

*Ключевые слова:* рекомбинантная вакцина, индуцибельная экспрессия, субъединица В холерного токсина, вектор.

Холера – широко распространенное в мире заболевание из числа особо опасных инфекций бактериальной природы. Проблема холеры по-прежнему актуальна для многих стран мира, в том числе и для России [3]. Реальная возможность внезапного возникновения эпидемических вспышек требует от соответствующих служб постоянной готовности к экстренному проведению мероприятий по локализации и ликвидации очагов холеры. В этих условиях специфическая иммунопрофилактика по-прежнему сохраняет важное значение в общей системе противоэпидемических мероприятий при холере. Однако существующие к настоящему времени холерные вакцины вследствие высокой реактогенности, низкой эффективности и непродолжительности поствакцинального иммунитета уже не рассматриваются как надежное средство защиты населения от холеры и требуют существенного совершенствования [5]. Согласно имеющимся данным, они обеспечивают защиту в среднем не более 50–60 % привитых людей в течение 3–6 месяцев [4]. В то же время результаты клинических, серологических и бактериологических исследований, полученные на добровольцах, повторно зараженных возбудителем холеры через 3 года после болезни, свидетельствуют о выработке довольно напряженного и продолжительного иммунитета, что указывает на возможность создания высокоэффективной противохолерной вакцины [4].

В последние годы особое внимание исследователей привлекает конструирование рекомбинантных живых вакцин для перорального применения. Рекомбинантные вакцины безопасны и безвредны для вакцинируемых, имеют высокие протективные свойства. Они могут быть использованы для разработки комплексных вакцин, создающих иммунитет одновременно против нескольких инфекций. Рекомбинантная вакцина позволяет использовать серологические методы дифференциальной диагностики для того, чтобы с высокой вероятностью отличать поствакцинальный иммунитет от иммунного от-

вета, развивающегося в случае естественного инфицирования [7, 8]. Пероральный способ вакцинации не вызывает отрицательных эмоций у прививаемых, при этом способе отсутствует опасность передачи инфекций [2].

Основными задачами при создании рекомбинантной вакцины являются идентификация и клонирование генов протективных белков возбудителей, разработка генно-инженерных конструкций, обеспечивающих необходимый уровень экспрессии протективных антигенов, изготовление лекарственных форм, проведение лабораторных и клинических испытаний.

Однако серьезной проблемой на пути создания рекомбинантной вакцины является быстрое снижение или полная утрата экспрессии протективных антигенов с конститутивным синтезом рекомбинантными штаммами, в результате чего такие штаммы уже не могут использоваться как вакцинные. В этой связи представлялось целесообразным создание рекомбинантного штамма с индуцируемой экспрессией протективного антигена, перспективного для последующего использования в качестве вакцинного. Предлагаемая стратегия индуцированного синтеза антигенов рекомбинантным вакцинным штаммом позволит регулировать антигенную нагрузку, выбрать оптимальную схему иммунизации с учетом индивидуальных особенностей вакцинируемого.

Образование антител к холерному экзотоксину рассматривается как важнейший фактор эффективности любой холерной вакцины [9]. Поэтому в качестве модели для клонирования был выбран ген *ctxB*, ответственный за синтез субъединицы В холерного токсина. Субъединица В отвечает за связывание холерного токсина с рецепторными зонами энтероцитов, но не обладает, без субъединицы А, токсичностью.

Для проведения работ по конструированию рекомбинантной плазмиды был использован вектор с промотором P<sub>trc</sub> (гибридный промотор, являющийся-

ся более эффективным, чем исходные регуляторные участки). Практическое применение этой векторной системы не привязано к одному штамму кишечной палочки и допускает использование штаммов дикого типа, так как индуцибельная экспрессия с него может осуществляться в любом генетическом окружении.

Цель настоящего исследования – получить рекомбинантный штамм *E. coli* с индуцибельной экспрессией субъединицы В холерного токсина, изучить особенности экспрессии клонированного гена, условия поддержания штамма, возможности использования его в перспективе в качестве вакцинного.

### Материалы и методы

В экспериментах использовали штаммы *Vibrio cholerae cholerae* 569В (серотип Инаба), *E. coli* Top10, *E. coli* Top10 (pTrcHis2С). Штаммы хранятся в коллекции микробных культур «48 ЦНИИ Минобороны России» в лиофильно высушенном состоянии под вакуумом при температуре минус 20 °С.

В качестве питательных сред использовали LB-бульон и агар. При необходимости в питательную среду добавляли антибиотики в следующих концентрациях: стрептомицин – 50 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в микропробирках вместимостью 0,6 мл на программируемом термостате «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Хромосомную ДНК *V. cholerae cholerae*, штамм 569В (серотип Инаба), используемую для амплификации, выделяли по методу Мармура [1]. При постановке ПЦР использовали следующие реагенты: фермент Таq-полимеразу активностью 2–5 ед./мкл и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты производства фирмы «СибЭнзим», деионизированную воду, минеральное масло производства фирмы «Sigma», праймеры suB1 – 5'-CCT CCT GGA TCC GAT TAA ATT AAA ATT TGG TG и suB2 – 5'-CCT CCT GAA TTC TTA ATT TGC CAT ACT AAT TGC, фланкирующие последовательность гена *ctxB* и содержащие специфические сайты узнавания рестриктаз BamHI и EcoRI соответственно. Дополнительные участки CCT CCT с 5'-концов праймеров включены для стабилизации двунитевой структуры концов амплификата. ПЦР проводили по следующей программе 94 °С – 5 мин; 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР фракционировали в 1,5 % агарозном геле и регистрировали результаты в ультрафиолетовом свете.

Для конструирования плазмид использовали рестриктазы BamHI, EcoRI и препарат ДНК-лигазы фага Т4 производства фирмы «Sigma».

Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК, гидролиз ДНК рестриктазами, скрининг плазмид, электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли, как описано в работе [1].

Секвенирование проводили на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI Prism 310 производства

Applied Biosystems с парой праймеров для секвенирования из набора поставки вектора pTrcHis2.

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ставили по У.К. Laemmli (ЭФ в ПААГ с ДСН) [10].

Для оценки индуцируемой экспрессии субъединицы В холерного токсина в 50 мл бульона LB, содержащего 50 мкг/мл ампициллина, инокулировали 1,0 мл исследуемой культуры. Бульонную культуру выращивали при температуре 37 °С при интенсивном встряхивании до оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм (клетки находятся в середине логарифмической фазы роста). После этого добавляли изопропил-d-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 ммоль и продолжали культивирование. Пробы отбирали через каждый час в течение 10 ч от начала индукции. Клетки собирали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин при температуре 4 °С, и готовили образцы для постановки белкового ЭФ в ПААГ с ДСН.

Реакцию двойной радиальной иммунодиффузии ставили по Оухтерлони [6]. В работе применяли сыворотку кроличью поликлональную против холерного токсина и препарат холерного токсина производства фирмы «Sigma».

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования нами была сконструирована плазида, состоящая из вектора pTrcHis2С и амплификата, полученного с парой праймеров SuB1 и SuB2, предназначенными для клонирования субъединицы В холерного токсина с сигнальной последовательностью и стоп-кодоном. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды представлена на рис. 1.

Отобранные после трансформации клоновые культуры изучали с использованием скрининга на на-

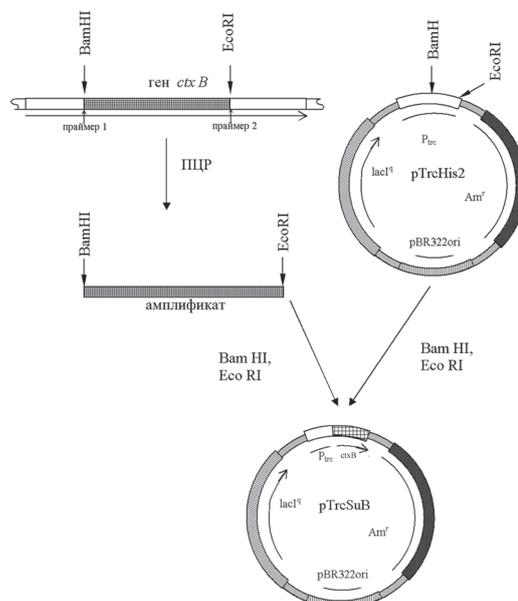


Рис.1. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды

личие в них плазмид расчетного размера, а также с помощью ПЦР с праймерами, использовавшимися для клонирования. По результатам последующего секвенирования клонированного фрагмента среди прошедших отбор трансформантов были выбраны клоны с запланированной молекулярной конструкцией.

Экспрессию субъединицы В оценивали методом ЭФ в ПААГ с ДСН. По результатам электрофореза была установлена продукция белка с молекулярной массой 11,0–12,0 кДа. Это соответствует молекулярной массе субъединицы В холерного токсина – 11,6 кДа. Продукция рекомбинантного белка началась через 1 ч после добавления ИПТГ и достигала максимума к 5-му часу (рис. 2).

Для подтверждения того, что синтезируемый белок является субъединицей В холерного токсина использовалась реакция двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони (рис. 3).

Полученные результаты подтверждают, что под воздействием ИПТГ в штамме *E. coli* Top10 (pTrcSuB) происходит синтез субъединицы В холерного токсина.

Важной характеристикой полученного штамма-продуцента является стабильность рекомбинантной плазмиды pTrcSuB в неселективных условиях поддержания. Для изучения стабильности рекомбинантной плазмиды штамм пересевали на LB-бульоне без добавления в среду культивирования ампициллина. Затем производили бактериальный высев культуры на чашки Петри с LB-агаром как с антибиотиком, так и без него, и подсчитывали процент клеток, утративших устойчивость к ампициллину и, следовательно, плазмиду pTrcSuB. Было установлено, что стабильность плазмиды тесно связана с ее формой в бактериальной клетке. Мономерная форма плазмиды стабильно наследовалась в неселективных условиях. Однако при многочисленных пересевах как в

неселективных, так и в селективных условиях происходило накопление клеток, утративших плазмиду в мономерной форме. Димерная и тримерная формы плазмиды оказались нестабильными и быстро элиминировались. При этом важно отметить следующее: с одной стороны, относительная нестабильность рекомбинантной плазмиды pTrcSuB является нежелательным признаком, затрудняющим поддержание штамма, с другой – эта особенность позволяет естественным образом освобождать в будущем организм вакцинируемого от рекомбинантного штамма.

Очевидно, что для изучения вопроса о возможности использования полученного штамма в качестве вакцинного становится важным его способность выживать в желудочно-кишечном тракте человека. Учитывая тот факт, что основной биомоделью при работе с холерой являются кролики (так называемая RITARD-технология [11]), нами была изучена способность штамма-продуцента выживать в кишечнике этих животных. Перед началом опыта исследовалась микрофлора кишечника животного по способности расти на LB-агаре с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл, изучались также морфологические и тинкториальные свойства микрофлоры. Перед введением рекомбинантного штамма кроликам, используя желудочный зонд, в полость желудка вводили 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия. Еще через 15 мин повторно вводили 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия и 1,0 мл 10-миллиардной суспензии исследуемого штамма. Через каждые 12 ч повторяли опыт по изучению состава микрофлоры кишечника. Введенный штамм высевался в течение первых 24 ч, причем его концентрация в кишечнике неуклонно снижалась. По всей видимости, штамм *E. coli* Top10 (pTrcSuB) не способен размножаться в кишечнике кроликов, что не позволило нам провести опыт по оценке иммуногенности. Дальнейшая «генетическая

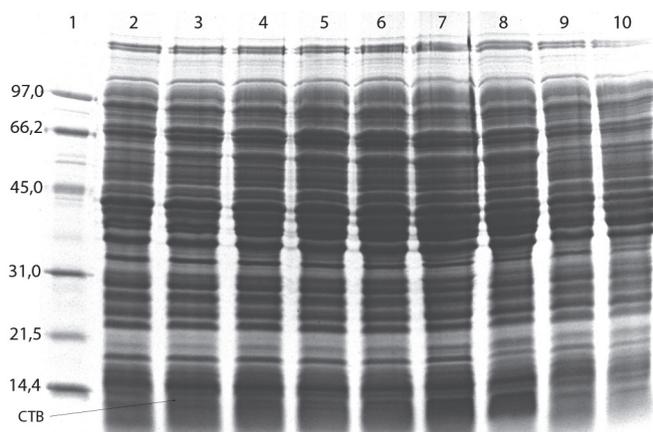


Рис. 2. Результаты индуцируемой экспрессии клонированного гена штаммом *E. coli* Top10 (pTrcSuB):

Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс в кДа; 2–8 – пробы бульонной культуры через 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 18 ч от начала индукции соответственно; 9, 10 – пробы бульонной культуры штамма *E. coli* Top10 через 0 и 18 ч от начала индукции (отрицательный контроль); CTB – рекомбинантный белок (субъединица В холерного токсина)

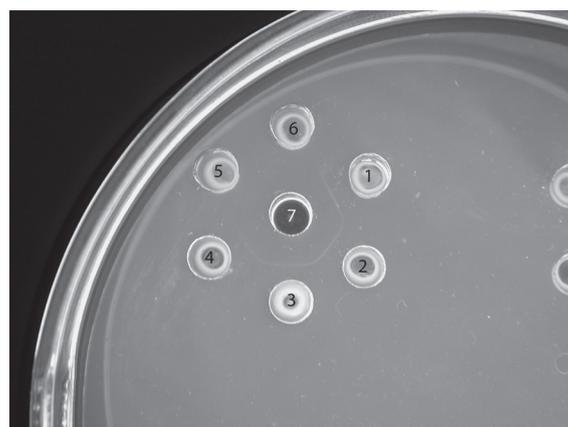


Рис. 3. Результаты реакции двойной радиальной иммунодиффузии штамма *E. coli* Top10 (pTrcSuB) через 5 ч после начала индукции:

1 – холерный токсин, 2 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:2), 3 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:4), 4 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:8), 5 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) неиндуцированный, 6 – штамм *E. coli* Top 10 (отрицательный контроль), 7 – сыворотка к холерному токсину

доработка» штамма или использование в качестве носителя плазмиды pTrcSuB другого штамма, более устойчивого в естественных условиях, способного выживать в желудочно-кишечном тракте и обеспечить продукцию субъединицы В холерного токсина, позволит, на наш взгляд, продолжить разработку рекомбинантной холерной вакцины.

Таким образом, представленные в работе результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования сконструированного нами штамма-продуцента *E. coli* Top10 (pTrcSuB) в качестве вакцинного и перспективности исследований в данном направлении. Предложенная схема индуцибельной экспрессии протективных антигенов рекомбинантным штаммом представляется особенно эффективной при разработке холерных вакцин для перорального применения, так как позволит создать необходимую антигенную нагрузку, что, в свою очередь, приведет к развитию напряженного и продолжительного иммунитета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девис Р., Ботстайн Д., Рот, Дж. Генетика бактерий. М.: Мир; 1984. 176 с.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 1999. 272 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
4. Покровский В.И., редактор. Холера в СССР в период VII пандемии. М.: Медицина; 2000. 472 с.
5. Смирнова Н.И., Кобкова И.М., Ливанова Л.Ф., Чеховская Г.В., Коннов Н.П., Лозовский Ю.В. Экспрессия гомологичных и гетерологичных генов протективных антигенов в клетках штамма *Escherichia coli* M17, используемого для изготовления лечебно-профилактического препарата колибактерина. Биотехнология. 2006; 4:13–22.
6. Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991. 116 с.

7. Choi J. H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 64(5):625–35.

8. Hase C.C., Thai L.S. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. Infect. Immun. 1994; 62(8):3051–7.

9. Kalambaheti T., Chaisri U., Srimanote P., Pongponratn E., Chaicumpa W. Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. Vaccine. 1998; 16(2–3):201–7.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680–5.

11. Spira W.M., Sack R.B., Froehlich J.L. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Infect. Immun. 1981; 32(2):739–47.

D.S.Yanov, S.N.Klinova, A.V.Mironin, I.V.Zhivov, I.P.Pogorelsky, V.I.Drobkov, Yu.N.Fedorov, Ya.A.Kibirev

#### Development of Methodic Approach to Construction of Recombinant Strain, Producer of the Cholera Toxin B Subunit

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov

Presented are the results of experiments on the construction of *Escherichia coli* Top10 (pTrcSuB) strain, perspective for the development of recombinant cholera vaccine for peroral use. The obtained strain possesses inducible expression of cholera toxin B subunit. Peculiarities of cloned gene expression in strain-producer and the conditions of its maintaining were studied. The proposed approach will allow to obtain effective and safe cholera vaccines.

**Key words:** recombinant vaccine, inducible expression, cholera toxin B subunit, vector.

#### Об авторах:

Янов Д.С., Клинова С.Н., Миронин А.В., Живов И.В., Погорельский И.П., Дробков В.И., Федоров Ю.Н., Кибирев Я.А. ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации». Киров.

#### Authors:

Yanov D.S., Klinova S.N., Mironin A.V., Zhivov I.V., Pogorelsky I.P., Drobkov V.I., Fedorov Yu.N., Kibirev Ya.A. 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov.

Поступила 16.02.10.