# Е.В.Монахова, Р.В.Писанов, Л.М.Веркина, А.В.Миронова

## КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ace VIBRIO CHOLERAE В ESCHERICHIA COLI

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону

Ген accessory cholera enterotoxin (ace) Vibrio cholerae, амплифицированный с помощью ПЦР, клонирован в составе векторной плазмиды pQE30 по сайтам BamHI-HindIII. Экспрессия гена происходит под контролем Т5-промотора. Штамм Escherichia coli M15[pREP4]pAce90 (КМ 194), содержащий рекомбинантную плазмиду, является активным продуцентом белка 6His-Ace, который обладает биологической активностью на модели мышей-сосунков, вызывая накопление жидкости в кишечнике. Продукт присутствует в клетках кишечной палочки в виде телец включения. Сконструированный штамм-продуцент может быть использован для получения препаратов Асе в целях изучения его значимости как фактора патогенности холерных вибрионов.

Ключевые слова: accessory cholera enterotoxin, холерный вибрион, клонирование генов, рекомбинантная плазмида.

# E.V.Monakhova, R.V.Pisanov, L.M.Verkina, A.V.Mironova

# Cloning and Expression of ace Gene of Vibrio cholerae in Escherichia coli

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don

Accessory cholera enterotoxin (ace) gene of *Vibrio cholerae*, amplified by PCR, is cloned into the BamHI-HindIII sites using plasmid pQE30. Expression of *ace* gene is under the control of T5 promotor. The *Escherichia coli* strain M15[pREP4]pAce90 (KM 194), containing recombinant plasmid, is an active producer of 6His-Ace protein, which possesses biological activity in the models of suckling mice and causes accumulation of fluid in the intestine. The product is contained in inclusion bodies found in the cells of coliform bacterium. The engineered producer strain can be used to obtain Ace preparations with a view to study its significance as pathogenicity factor in cholera vibrio.

Key words: accessory cholera enterotoxin, cholera vibrio, gene cloning, recombinant plasmid.

Accessory cholera enterotoxin (Ace) относят к числу дополнительных факторов вирулентности холерных вибрионов [9–12]. Кодирующий его ген асе вместе с генами cep, orfU, zot и ctxAB входит в состав коровой области генома умеренного филаментозного фага СТХф, интегрированного в хромосому Vibrio cholerae и способного к горизонтальной передаче перечисленных генов от штамма к штамму [6, 12]. Асе представляет собой гидрофобный белок с молекулярной массой (ММ) 11,4 килодальтон (кДа), который способен агрегироваться в димер с образованием структуры, сходной с ион-проницаемой порой [10, 11]. Известно, что он является одновременно необходимой составляющей фагового морфогенеза [6, 12] и диареегенным фактором, поскольку способен вызывать накопление жидкости в изолированных петлях кишечника кролика и повышение тока короткого замыкания (І) в ткани кишечника при исследовании в камерах Юссинга [9]. Предполагаемый механизм действия Асе заключается во встраивании гидрофобной α-спирали этого белка в мембрану энтероцита (формирование поры), вследствие чего жидкость с ионами поступает обратно в просвет кишечника, вызывая диарею [10, 11]. Однако его роль в патогенезе холеры до сих пор не доказана и оспаривалась некоторыми авторами [6].

Дальнейшее изучение биологической активности Асе требует наличия его препаратов, наиболее перспективным способом получения которых явля-

ется использование продуцентов – рекомбинантных штаммов микроорганизмов, содержащих клонированный ген асе, поскольку холерные вибрионы синтезируют крайне низкие количества этого белка [10] на фоне продукции целого ряда других токсинов. Panee M.Trucksis et al. [10] ген асе был клонирован в составе хромосомной ДНК дрожжей Pichia pastoris. Полученный рекомбинантный клон оказался активным продуцентом искомого белка. Вместе с тем, возможность его технологического применения ограничена длительным периодом культивирования (36-48 ч) и крайней токсичностью используемого в качестве индуктора метилового спирта. В последующем о клонировании гена ace в Escherichia coli в составе вектора pBAD/Thio-TOPO сообщала группа исследователей из Малайзии [7, 8]. После продолжительной индукции (60-72 ч) арабинозой рекомбинантный штамм продуцировал Асе в форме «сплава» с белком НР-тиоредоксином общей ММ 34 кДа, биологическая активность которого авторами не изучалась. Поэтому вопрос о полном соответствии его свойств таковым нативного Асе, продуцируемого холерными вибрионами, остался открытым.

Целью работы явилось клонирование гена ace в составе плазмидного вектора pQE30, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем Т5-промотора, и создание штамма  $E.\ coli$  — продуцента нативного и функционально активного белка Ace  $V.\ cholerae$ .

#### Материалы и методы

Донором ДНК для амплификации гена *ace* служил штамм *V. cholerae* O1 15500 биовара эльтор, содержащий неполный СТХ-профаг (pre-CTX) [5].

В качестве хозяина для трансформации рекомбинантных плазмид использовали штаммы  $E.\ coli$  Jm103 (thi, strA, endA, sbcB15, hsdR4,  $\Delta$ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI $^q$ Z  $\Delta$ M15]) (Pharmacia) и M15[pREP4] (NaIS, StrS, RifS, Thi–, Lac–, Ara+, Gal+, Mtl–, F–, RecA+, Uvr+, Lon+) (QIAGEN), в качестве вектора для клонирования – плазмиду pQE30 (QIAGEN).

Для культивирования штамма *E. coli* Jm103 использовали жидкую и агаризованную среду LB; для M15[pREP4] к средам добавляли 25 мг/мл канамицина, а для соответствующих рекомбинантов – дополнительно 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. В качестве индуктора использовали изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) в конечной концентрации 1 мМ.

Хромосомную и плазмидную ДНК выделяли из клеток холерного вибриона и кишечной палочки в соответствии с общепринятыми методами [1].

Конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК и детекции гена *асе* осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI Suit 9; синтез праймеров выполнен ООО «СибЭнзим» (Новосибирск). Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик МЦ-2» («ДНК-технология»). По окончании реакции смесь подвергали электрофорезу в 0,7% агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия, затем просматривали в ультрафиолетовом свете, вырезали участок геля с амплифицированным фрагментом размером 311 п.н., выделяли последний элюцией, очищали смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1 и осаждали этиловым спиртом.

ДНК плазмиды и амплификата гена асе расщепляли эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII (Fermentas UAB) в течение 3–4 ч в соответствующем каждому ферменту буфере. Линейную форму плазмиды и амплификат после рестрикции очищали в 0,7 % агарозном геле и лигировали с использованием ДНК-лигазы Т4 (Fermentas UAB) согласно рекомендациям изготовителя. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Jm103, приготовленные с помощью обработки хлористым кальцием [1]. Трансформанты высевали на агар LB, содержащий 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. Посевы культивировали при 37 °C в течение ночи. Отбирали ампициллинрезистентные колонии и определяли присутствие асе с помощью праймеров для детекции гена. Из позитивных клонов выделяли плазмидную ДНК [1], подтверждали наличие в ней вставки гена ace рестрикцией BamHI и HindIII с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Рекомбинантной плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli* M15[pREP4]; полученные клоны проверяли на присутствие гена *ace* и плазмиды, как описано выше.

Для выявления способности к синтезу Асе рекомбинантный штамм E. coli M15[pREP4]pAce90, а также контрольный, содержащий векторную плазмиду pQE30 без вставки, выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, в течение 3-4 ч при 37 °C с шуттелированием при 150 об./мин и затем индуцировали 1 мМ ИПТГ в течение 1, 2, 3 и 4 ч при 37 °C с шуттелированием при 150 об./мин, клетки осаждали центрифугированием, лизировали в буфере, содержащем 65 мМ трис-НСІ (рН 6,8), 1 % SDS и 10 мМ 2-меркаптоэтанола, при температуре 96 °C в течение 15 мин. Лизат подвергали электрофорезу в 16,5 % ПААГ с SDS и окрашивали гель Coomassi Blue R250 и нитратом серебра. Процентное содержание 6His-белка по отношению к суммарным клеточным белкам определяли с помощью программы Quantity One.

Для определения локализации искомого продукта осадки клеток ресуспендировали в 50 мМ Nа-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и 2 мг/мл лизоцима, инкубировали на льду в течение 30 мин, добавляли тритон X-100 до 1 % и ДНКазу до 5 мкг/мл, продолжали инкубацию на льду в течение 10 мин, затем замораживали в жидком азоте. После размораживания разделяли растворимую и нерастворимую фракции центрифугированием, добавляли к обеим лизис-буфер, прогревали при 100 °С в течение 10 мин и исследовали в электрофорезе.

Для исследований *in vivo* использовали осветленные ультразвуковые дезинтеграты (ОД) клеток рекомбинантного и контрольного штаммов, приготовленные как описано ранее [3], и нерастворимую фракцию, которую растворяли в 8 М мочевине, разбавляли равным объемом 10 мМ трис-HCl (рН 8,0), осветляли центрифугированием и подвергали многоступенчатому диализу с постепенным снижением концентрации мочевины в диализном буфере. Содержание белка в препаратах определяли методом Лоури и доводили до 500 мкг/мл.

Для изучения биологической активности мышамсосункам массой 3—4 г через задний проход вводили по 100 мкл препаратов (по 50 мкг общего белка на одно животное). Через 5 ч после введения животных умерщвляли и определяли FA (отношение массы желудка и кишечника к массе тела) [3]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Primer of Biostatistics» v.4.03.

## Результаты и обсуждение

Схема констуирования рекомбинантной плазмиды рАсе90 показана на рис. 1, из которого видно, что ПЦР-амплификат ace (311 п.н.) был встроен в плазмиду pQE30 по сайтам BamHI-HindIII. Использованный нами плазмидный вектор несет ген устойчивости к ампициллину (bla) и содержит промоторно-операторную

область, включающую Т5-промотор и два расположенных тандемом *lac*-оператора, обеспечивающих максимальную репрессию синтеза Асе в присутствии глюкозы, а также синтетический сайт связывания рибосомальной РНК, старт-кодон, последовательность триплетов, кодирующих синтез гексагистидина (6His), полилинкер (MCS) и два терминатора транскрипции (t0 фага лямбда и T1 из rrnB-оперона  $E.\ coli$ ). Экспрессия клонированных генов происходит при индукции ИПТГ и начинается с плазмидного старткодона, при этом образуется гибридный белок, перед первой аминокислотой которого располагается гексагистидиновый блок (6His-tag). В ожидаемом продукте на N-конце должно было содержаться 12 дополнительных аминокислотных остатков, первые шесть из которых представляли 6His-tag.

В результате трансформации компетентных клеток *E. coli* Jm103 лигазными смесями были получены клоны, несущие рекомбинантную плазмиду, обозначенную рАсе90. Гидролиз этой плазмиды *Bam*НІ и *Hind*ПІ с последующим электрофорезом в агарозном геле подтвердил наличие вставки размером 0,3 т.п.н. Рекомбинантные клоны штамма *E. coli* Jm103, однако, не выдерживали длительного хранения на питательных средах даже в присутствии глюкозы и требовали частых пересевов, вероятно, в связи с недостаточно эффективной репрессией Т5-промотора и токсичностью продукта клонированного гена для *E. coli*. С целью создания более жизнеспособного продуцента мы трансформировали рекомбинантную плазмиду в штамм M15[pREP4], содержащий низ-

кокопийную плазмиду pREP4, обеспечивающую дополнительную репрессию T5-промотора за счет конститутивной экспрессии входящего в ее состав гена *lac1*. Действительно, трансформанты M15[pREP4] оказались более жизнеспособными по сравнению с таковыми штамма Jm103.

Для выявления способности рекомбинантов к продукции токсина мы использовали лизаты клеток штаммов E. coli M15[pREP4]pAce90 и M15[pREP4] рQЕ30 (контроль), выращенные с индукцией ИПТГ. После SDS-электрофореза в 16,5 % ПААГ и окрашивания геля нитратом серебра только в лизате штамма M15[pREP4]pAce90 была выявлена мажорная белковая полоса в области 13 кДа (отсутствующая в лизате контрольного штамма), что соответствует размеру искомого рекомбинантного белка, содержащего на N-конце гексагистидиновый блок (рис. 2, Б). На рис. 2 (А) показан тот же гель, предварительно окрашенный Coomassi Blue, в котором упомянутая полоса отсутствует. Она проявилась только после докрашивания геля нитратом серебра, что свидетельствует в пользу того, что она действительно представляет собой Асе, который, как известно, не окрашивается Coomassi Blue [11]. Его количество, по данным программы Quantity One, составило 7–10 % суммарных клеточных белков. Большая часть Асе находилась в клетках в виде телец включения, однако некоторое количество присутствовало и в растворимой фракции (рис. 2, В).

ОД рекомбинантного клона и нерастворимая фракция вызывали статистически достоверное на-

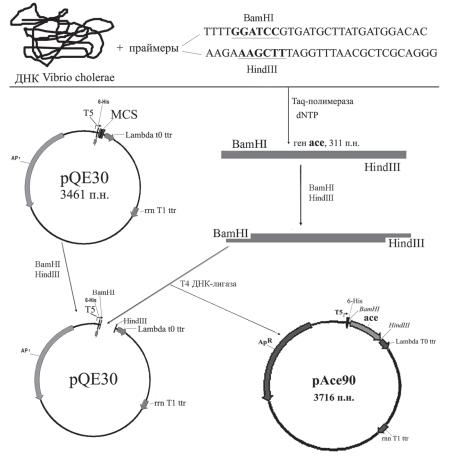


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pAce90

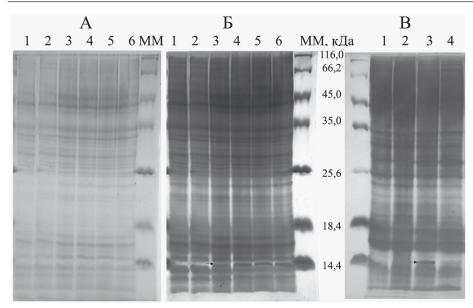


Рис. 2. SDS-электрофорез в 16,5 % ПААГ лизатов клеток  $(A, \mathbf{E})$  E. coliM15[pREP4]pQE30, M15[pREP4]pAC90 и их растворимой и нерастворимой фракций. A – окраска Coomassi Blue;  $\vec{b}$  – тот же гель, докрашенный нитратом серебра; В - фракции клеток, выращенных с индукцией. Положение рекомбинантного белка Асе отмечено стрелками:

**А, Б**: 1 – M15[pREP4]pQE30 (контроль), 2 - M15[pREP4]pAce90 без индукции, 3, 4, 5, 6 – M15[pREP4]pAce90 с индукцией ИПТГ в течение 1, 2, 3 и 4 ч соответственно. **В**: 1 — нерастворимая; 2 — растворимая

фракции клеток M15[pREP4]pQE30; 3 – нерастворимая; 4 – растворимая фракции клеток M15[pREP4]pAce90

копление жидкости в кишечнике мышей-сосунков в дозе 50 мкг общего белка на одно животное (таблица). Поскольку ОД контрольного штамма не обладал такой активностью, мы сочли наиболее вероятным, что наблюдаемый эффект обусловлен именно дей-

Таким образом, гибридный рекомбинантный белок Асе, несмотря на присутствие в его молекуле дополнительных аминокислотных остатков, обладает биологической активностью - способностью вызывать накопление жидкости в кишечнике мышей-сосунков.

Рекомбинантный штамм *E. coli* M15[pREP4] рАсе90 депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 194 и защищен патентом на изобретение [4]. Использование его в качестве продуцента Асе в перспективе позволит выделять очищенный препарат с помощью специфически связывающих 6Hisбелков сорбентов в целях изучения его значимости в патогенезе холеры, особенно вызываемой нехолерогенными штаммами холерных вибрионов, содержащими неполный СТХ-профаг (pre-СТХ) [5]. Преимуществами предлагаемого продуцента, по сравнению с холерными вибрионами, является высокий выход искомого белка и отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных токсических субстанций, которые могли бы затруднить его выделение и очистку, а по сравнению с известными рекомбинантными штаммами-продуцентами [7, 8, 10] – непродолжительный период наращивания биомассы (4-6 ч, включая индукцию), что обеспечивает возможность ускоренного получения токсина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984.

480 с. 2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Михась Н.К., Писанов Р.В.

2. моналова Е.В., Ломов Ю.М., Михась П.К., Писанов Р.В. Структура и изменчивость неполного СТХ-элемента холерных вибрионов. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):58-61.

3. монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В. и др. Клонирование гена цитотонического фактора Сеf (СНО-cell elongating factor) Vibrio cholerae в Escherichia coli и его экспрессия под контролем Р<sub>ВАО</sub>-

промотора. Биотехнология. 2005; 5:12–8. 4. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированный ген ace Vibrio cholerae, и штамм Escherichia coli – продуцент accessory cholera enterotoxin Vibrio cholerae. Патент РФ № 2313576, опубл. 27.12.2007. 5. Монахова Е.В., Миронова А.В., Алексеева Л.П., Мазрухо

А.Б. Изучение вирулентности холерных вибрионов, содержащих A.Б. Изучение вирулентности холерных виорионов, содержащих pre-CTXф: генотипическая и фенотипическая характеристика. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:27–32. 6. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol. Mol. Biol. Rew. 1998; 62:1301–14.

7. Somarny W.M., Mariana N.S., Neela V., Rozita R., Raha A.R. Ontimisation of prepared response of prepared response of the proposed respons

Optimization of parameters for accessory cholera enterotoxin (Ace) protein expression. J. Med. Sci. 2002; 2:74–6.

8. Somarny W.M., Mariana N.S., Rozita R., Raha A.R. Cloning and expression of Vibrio cholerae virulence gene, accessory cholera enterotoxin (ace). Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 2004;

enterotoxin (ace). Southeast Asian 3. 116p. 1162.

35:856–62.

9. Trucksis M., Conn T.L., Wasserman S.S., Sears C.L. Vibrio cholerae ACE stimulates Ca\*-dependent Cl\*/HCO, secretion in T84 cells in vitro. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000; 279:567–77.

10. Trucksis M., Conn T.L., Fasano A., Kaper J.B. Production of Vibrio cholerae accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast Pichia pastoris. Infect. Immun. 1997; 65:4984–8.

11. Trucksis M., Galen G.E., Michalski J., Fasano A., Kaper J. B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a V. cholerae virulence cassette. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90:5267–71.

virulence cassette. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90:5267–71. 12. *Waldor M.K., Mekalanos J.J.* Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996; 272:1910–4.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Maniatis T., Frich E., Sembruk G. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning.]. M.: Mir; 1964. 479 p.
2. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Mikhas 'N.K., Pisanov R.V. [Structure and variability of the deficient CTX-element of the cholera vibrios]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 93:58–61.
3. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Mironova A.V. et al. [Cloning of the Vibrio cholerae CHO-cell elongating factor under control of PBAD promoter]. Biotekhnologia. 2006; 5:12–18.
4. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Verkina L.M., Markina O.V., Mironova A.V. [Recombinant plasmid expressing the cloned ace gene of Vibrio cholerae, and Escherichia coli strain – the producer of accessory cholera enterotoxin of Vibrio cholerae]. RF Patent № 2313576.
5. Monakhova E.V., Mironova A.V., Alekseeva L.P., Mazrukho A.B. [The study of pre-CTXφ carrying Vibrio cholerae virulence: genotypic and phenotypic characteristics]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:27–32.

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Verkina L.M., Mironova A.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor`kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

#### Об авторах:

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: ститут. 344002, plague@aaanet.ru

Поступила 17.02.11.