

Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Гусева Н.П.

Конструирование рекомбинантного штамма-продуцента белка Тср холерного вибриона и подбор оптимальных условий для его культивирования

Холера – особо опасная инфекционная болезнь бактериальной природы, которая в виде эпидемий до сих пор регистрируется во многих эндемичных регионах. Значительное усиление неконтролируемой миграции населения из стран с низким уровнем санитарного контроля создает реальную угрозу возникновения эпидемических вспышек на территории Российской Федерации. Учитывая это, исследования, направленные на создание эффективных средств диагностики и профилактики холеры, все чаще становятся объектом внимания отечественных и зарубежных ученых.

Патогенный потенциал возбудителя холеры определяется несколькими факторами, среди которых значимую роль играет уникальная способность к колонизации тонкого кишечника человека за счет токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТСР), которые являются важным протективным антигеном, обладающим сильно выраженными защитными свойствами.

Получение белка ТСР из нативных препаратов связано со сложностью отделения его от других поверхностных белков холерного вибриона.

Разработанные в последние годы технологии дают возможность в короткие сроки и в больших количествах получать биологически активные белки. Применяемые молекулярно-генетические подходы позволяют разрабатывать наиболее оптимальные варианты штаммов продуцентов, уровень биосинтеза целевого продукта которых может составлять десятки процентов от общего количества протеинов в клетке.

Цели и задачи работы: Цель работы - конструирование штамма продуцента белка токсин-корегулируемых пилей адгезии (TCP) холерного вибриона.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Поиск и сравнение нуклеотидных последовательностей штаммов *V.cholerae M1430* и *V.cholerae CIRS101* в NCBI GeneBank для расчёта праймеров, фланкирующих полную последовательность гена *tcpA*.
2. Создание рекомбинантной плазмиды pCR2.1 с полным геном *tcpA* и трансформация данной конструкции в штамм *E.coli TOP10*.
3. Клонирование участка гена *tcpA* из штамма *E.coli TOP10pCR2.1tcpA* в вектор pET302, трансформация в штамм для экспрессии *Escherichia coli BL21(DE3)Star*.
4. Подбор оптимальных условий культивирования рекомбинантного штамма для получения наибольшего количества белка в растворимой форме.

На основе проведенного сравнения нуклеотидных последовательностей штаммов *V.cholerae M1430* и *V.cholerae CIRS101* было установлено отсутствие различий в нуклеотидной последовательности гена *tcpA* и были сконструированы праймеры, фланкирующие полную нуклеотидную последовательность гена *tcpA* со Start и Stop-кодоном. Донором ДНК для амплификации гена *tcpA* служил штамм *Vibrio cholerae M1430* биовара Эль Тор. В качестве вектора для клонирования использовали плазмиду pCR2.1. По окончании реакции смесь подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, затем просматривали в ультрафиолетовом свете и вырезали из геля ампликон размером 701 п.н., чистили на колонках. Плазмидную ДНК и ампликон гена *tcpA* лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы, затем лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli*

TOP10. Отбирали ампициллинрезистентные колонии и определяли присутствие гена *tcpA* с помощью праймеров для детекции гена. Нуклеотидные последовательности полученных клонов штамма *E.coli TOP10pCR2.1tcpA* были секвенированы. Результаты показали идентичность нуклеотидной последовательности клона и контрольного штамма.

Полученный штамм относится к биобезопасным согласно пункту 3.3.8. санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с рекомбинантными молекулами ДНК». Все дальнейшие работы проводили на матрице плазмидной ДНК штамма *E.coli TOP10pCR2.1tcpA*.

Штамм *Escherichia coli BL21(DE3)Star pET302tcpAcirs* был создан на основе экспрессирующей системы реципиента *Escherichia coli BL21(DE3)Star* [*E.coli* В F- *dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal (DE3) me131*] путём трансформации бактериальных клеток плазмидным вектором pET302 (Invitrogen) с клонированным участком гена *tcpA* из штамма *E.coli TOP10pCR2.1tcpA* по сайтам рестрикции XhoI и BamHI. В этой конструкции продуцента биосинтез целевого протеина находится под транскрипционным контролем промотора фага T7 и индуцируется с помощью изопропил-β-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Наличие в плазмиде pET302 полигистидиновой метки дает возможность выделения белка с помощью аффинной хроматографии на коммерческих колонках с никель-хелатным сорбентом.

Поскольку ампликон необходимо было встроить в плазмидный вектор pET302 в ориентации, обеспечивающей направление транскрипции под контролем T7-промотора, на 5'-конце каждого праймера внесен сайт рестрикции для эндонуклеазы, образующей липкие концы: XhoI - для прямого праймера, и BamHI - для обратного праймера, в соответствии с порядком расположения сайтов рестрикции в полилинкере векторной плазмиды. Соответствующие сайты рестрикции не входили в состав последовательностей клонируемых генов. По окончании реакции амплификации смесь подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле в трис-ацетатном буфере, затем

просматривали в ультрафиолетовом свете, вырезали участок геля с фрагментом ДНК размером 534 п.н. и выделяли с помощью набора PCR Clear-Up-System.

ДНК плазмиды и ампликон гена *tcpA* расщепляли эндонуклеазами рестрикции XhoI и BamHI в течение 15 минут, затем линейную форму плазмиды и ампликон лигировали с использованием T4 ДНК-лигазы согласно рекомендациям изготовителя. Трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli BL21(DE3)Star* рекомбинантной плазмидой проводили методом электропорации согласно стандартным протоколам. Трансформированные клетки высевали на селективную среду с добавлением X-gal и IPTG для синей-белой селекции.

Нуклеотидная последовательность для клонирования не включала в себя лидерный пептид, состоящий из 25 аминокислот, который отщепляется в процессе посттрансляционного превращения пропоследовательности в зрелый пептид. Также мы исключили альфа-спираль, которая характерна для всех пилей адгезии IV типа.

Для подтверждения отсутствия амплификационных ошибок отобранные четыре клон секвенировали. Результаты секвенирования показали наличие в первых трех клонх несинонимичной замены в позиции 179 п.н., приводящей к замене аминокислоты лизина на треонин. Четвертый клон полностью соответствовал нуклеотидной последовательности фрагмента гена *tcpA cirs*.

Содержание целевого протеина в клетках штамма *E.coli BL21(DE3) pET302TcpA cirs*, выращенных с индукцией, оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12,5% ПААГ в присутствии 0,1% SDS с последующим окрашиванием геля раствором Кумасси G-250 по методу Лэммли. В ПААГ была выявлена белковая линия в осадке и супернатанте с ММ~20,7 кДа, которая отсутствовала у контрольного штамма, содержащего векторную плазмиду.

Известно, что при высоком уровне экспрессии клонируемых генов их продукты могут накапливаться в клетках микроорганизмов в виде телец

включений, в которых рекомбинантный белок находится в инактивированном состоянии. Это весьма усложняет процесс получения целевого протеина в биологически активной форме, поскольку возникает необходимость применять специальные физико-химические методы рефолдирования. Для увеличения образования растворимой формы белка нами был проведен ряд экспериментов по оптимизации условий культивирования штамма *E. coli BL21(DE3) Star pET302 tcpAcirs* по следующим параметрам: концентрация ИПТГ, время индукции и температура. На первом этапе мы использовали четыре концентрации ИПТГ: 0,1мМ, 0,25мМ, 0,5 мМ, 1мМ. Культивировали 4 часа на шейкере-инкубаторе при температуре 37С. Полученные образцы осадок и супернатант наносили на 12,5% полиакриламидный гель (ПААГ). Из электрофореграммы, отражающей динамику биосинтеза целевого белка, следует, что концентрация IPTG не влияет на образование белка в растворимой форме.

На втором этапе подбирали оптимальное время культивирования после индукции: 1ч, 2ч, 3ч и 4 ч. Полученные пробы осадок и супернатант наносили на SDS фореуз. Из электрофореграммы следует, что наибольшее накопление целевого белка в нативной форме наблюдается при условиях культивирования 2 часа, температуре 37С и концентрации ИПТГ 0,1мМ.

На третьем этапе выращивали штамм при температуре 30`С с добавлением разных концентраций ИПТГ(0,1мМ, 0,25мМ,0,5 мМ, 1мМ) Результаты белкового фореуза показали наибольшее присутствие целевого белка в осадке, это свидетельствует о накоплении белка в тельцах включений.

Таким образом, в процессе оптимизации параметров культивирования и индукции синтеза рекомбинантного белка ТсрА ,пришли к выводу, что оптимальными условиями культивирования можно считать время культивирования-2 часа температуру 37С, и концентрацию ИПТГ 0,1мМ.

В настоящее время ведется отработка методики очистки рекомбинантного белка на His-колонках с никель-хелатным сорбентом для аффинной хроматографии. Использование рекомбинантного штамма *E. coli BL21(DE3)*

Star pET302 tcpAcirs в качестве продуцента белка ТсрА в перспективе позволит выделять очищенный препарат с использованием специфически связывающих 6His-белки сорбентов.

Выводы:

- Получен штамм (*E.coliTOP10PCR2.1tcpA*) с полной нуклеотидной последовательностью гена *tcpA* для дальнейшей безопасной работы.
- Сконструирован штамм(*E.coli BL21(DE3)Star pET302tcpA*) продуцент белка токсин-корегулируемых пилей адгезии.
- Подобраны оптимальные условия культивирования штамма-продуцента белка Тср: 37°С , 2 часа и концентрация ИПТГ 0,1мМ

Дальнейшее направление исследований:

1. Выделение белка ТсрА в денатурирующих условиях из телец включений и его рефолдинг.
2. Подбор схемы иммунизации лабораторных животных очищенным белком ТсрА
3. Получение сыворотки иммунизированных животных
4. Сравнение иммунологической активности нативного и денатурированного белка
5. Постановка дот-иммуноанализа с различными штаммами