

Е.В.Монахова, Р.В.Писанов, Г.В.Демидова, Н.Б.Непомнящая

ШТАММ *ESCHERICHIA COLI* – СУПЕРПРОДУЦЕНТ ГЕМОЛИЗИНА *VIBRIO CHOLERAЕ*

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

Целью работы явилось клонирование гена *hlyA* *Vibrio cholerae* в составе плазмидного вектора, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем T5-промотора, и создание штамма *E. coli* – суперпродуцента рекомбинантного гемолитина. **Материалы и методы.** Донором ДНК служил штамм *V. cholerae* O1, векторной плазмидой – pQE30. Ген амплифицировали с помощью ПЦР, клонирование осуществляли общепринятыми методами, продуктивность рекомбинантов и локализацию искомого белка определяли по результатам электрофореза лизатов клеток. **Результаты и выводы.** Сконструирована рекомбинантная плазида pHlyA, экспрессирующая клонированный ген *hlyA* *V. cholerae* Эль Тор под контролем T5-промотора при индукции ИПТГ. Содержащий ее штамм *E. coli* M15[pREP4]pHlyA является суперпродуцентом гемолитина: количество продукта в лизатах его целых клеток достигает 13 %, а в тельцах включения – 17 % суммарных клеточных белков. Продукт клонированного гена несмотря на отсутствие процессинга и присутствие на N-конце гексагистидинового блока (6His-tag) обладает гемолитической активностью по отношению к эритроцитам барана. Наличие 6His-tag позволит выделять очищенный препарат с помощью специфических сорбентов в целях создания диагностикумов, а также изучения значимости гемолитина как фактора патогенности/персистенции. Преимуществами данного продуцента являются высокий выход искомого белка, отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных биологически активных субстанций, непродолжительный период наращивания биомассы (4–6 ч включая индукцию) и возможность культивирования без соблюдения режима работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Ключевые слова: гемолитин *Vibrio cholerae*, клонирование генов, рекомбинантная плазида, суперпродуцент.

Корреспондирующий автор: . Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru, unicorn54@mail.ru.

E.V.Monakhova, R.V.Pisanov, G.V.Demidova, N.B.Nepomnyashchaya

Escherichia coli Strain – Super-Producer of *Vibrio cholerae* Hemolysin

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

Objective of this work was the cloning of *Vibrio cholerae hlyA* gene in a plasmid vector providing expression of foreign genes under the control of T5 promoter, and construction of *E. coli* strain – super-producer of *Vibrio cholerae* recombinant hemolysin. **Materials and methods.** *V. cholerae* O1 strain served as a DNA donor, pQE30 – as a vector plasmid. The gene was PCR-amplified, cloning was carried out by means of conventional methods, productivity of recombinants and localization of the required protein was determined based on the results of electrophoresis of cell lysates. **Results and conclusions.** A recombinant plasmid pHlyA, expressing the cloned *hlyA* gene of *Vibrio cholerae* El Tor under the control of T5 promoter after IPTG induction, has been constructed. Carrying this plasmid strain *E. coli* M15[pREP4]pHlyA is the super-producer of hemolysin: the content of the product in whole cell lysates is up to 13 %, and in inclusion bodies – up to 17 % of the total cell proteins. The product of the cloned gene, in spite of the absence of proteolytic processing and presence of the hexahistidine block (6His-tag) at its N-terminus, possesses hemolytic activity towards sheep erythrocytes. 6His-tag will provide for obtaining a purified preparation on specific sorbents with a view to create diagnosticums as well as to study the significance of hemolysin as a pathogenicity/persistence factor. The advantages of this producer are the high output of the required protein, inability of synthesis of any accessory biologically active substances, short-term period of biomass growing (4–6 h including induction) and possibility of culturing without sticking to the guidelines for work with the agents of particularly dangerous infections.

Key words: *Vibrio cholerae* hemolysin, gene cloning, recombinant plasmid, super-producer.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Citation: Monakhova E.V., Pisanov R.V., Demidova G.V., Nepomnyashchaya N.B. *Escherichia coli* Strain – Super-Producer of *Vibrio cholerae* Hemolysin. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 1:90–93. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-90-93

Растворимый гемолитин (HlyA) холерных вибрионов Эль Тор является одним из факторов патогенности холерных вибрионов Эль Тор [4], а также, по всей видимости, может способствовать их персистенции в объектах окружающей среды, поскольку подавляет рост других бактерий и беспозвоночных [5, 9]. В нашей стране способность к его продукции до настоящего времени используется в качестве показателя отсутствия токсигенности и эпидемической опасности возбудителей [3]. Обычно гемолитич-

ность штаммов проверяют в пробе Грейга. Данный метод имеет ряд существенных недостатков в связи с нестандартностью и необходимостью постоянно иметь в распоряжении свежие эритроциты барана, что возможно далеко не во всех диагностических лабораториях, а консервированные, как показывает практика, дают нестабильные результаты. Это обуславливает актуальность разработки альтернативных диагностикумов на основе специфических антител. В свою очередь, для их создания требуются

препаративные количества искомого антигена, наиболее эффективным способом получения которых остается использование лабораторных штаммов *E. coli* – эффективных продуцентов рекомбинантных белков. Ранее нами был сконструирован штамм *E. coli* D1210pES4H, содержащий в составе рекомбинантной плазмиды pES4H, помимо гена *hlyA*, гены *hlyB* и *lipA* и экспрессирующий их под контролем собственных промоторов [1]. Неконтролируемая экспрессия и наличие в клетках нецелевых продуктов дополнительных генов затрудняли очистку искомого белка. Такими же недостатками обладали и плазмиды, сконструированные другими авторами – pPM431 [7] и pSG1012 [6], содержащие в составе векторной плазмиды pBR322 фрагменты ДНК *V. cholerae* длиной соответственно 6,2 и 3,6 т.п.н., включающие ген *hlyA*, хотя выделение препарата не входило в задачи исследований авторов, и продуктивность содержащих эти плазмиды штаммов (трансформантов *E. coli* K-12) осталась неизвестной.

Поэтому целью настоящей работы явилось клонирование гена *hlyA* в составе плазмидного вектора, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем мощного T5-промотора, и создание штамма *E. coli* – суперпродуцента рекомбинантного гемолизина *V. cholerae*.

Материалы и методы

Донором ДНК для клонирования гена *hlyA* служил высокогемолитичный нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 9337 биовара Эль Тор, реципиентами – штаммы *E. coli* HB101, C600, BW, Jm101, Jm103, JM109, Stratagen, M15[pREP4].

Геномную ДНК выделяли с помощью комплекта реагентов «Проба-НК» (ДНК-Технология, Россия), плазмидную – методом Бирнбойма, как описано ранее [1, 2].

В качестве векторной плазмиды использовали pQE30 (QIAGEN). Праймеры для клонирования конструировали с помощью Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Фрагмент и вектор гидролизовали эндонуклеазами BamHI и PstI и лигировали T4-ДНК-лигазой в прилагаемых буферах согласно рекомендациям изготовителя (ThermoScientific, USA). Лигазными смесями трансформировали компетентные клетки *E. coli* Jm103, приготовленные накануне обработкой хлористым кальцием. После стандартной процедуры трансформации (0 °C – 40 мин, 42 °C – 2 мин, 0 °C – 5 мин) клетки разводили в 10 раз средой LB с 0,5 % глюкозы, подрачивали в течение 1 ч и высевали на агар LB, содержащий 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. Посевы инкубировали при 37 °C и на следующие сутки отбирали ампициллин-резистентные колонии.

Рекомбинантные клоны идентифицировали по результатам ПЦР и наличию гемолитической активности по отношению к эритроцитам барана в лунках кровяного агара. Далее из них выделяли плазмид-

ную ДНК и подтверждали наличие вставок рестрикцией BamHI и PstI с последующим электрофорезом в 0,7 % агарозном геле.

Для оценки уровней экспрессии гена в разных штаммах *E. coli*, трансформированных рекомбинантной плазмидой, их выращивали в бульоне LB, содержащем 50 мкг/мл ампициллина, с шуттелированием в течение 4 ч, затем добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали шуттелирование в течение еще 1,5 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием, растворяли осадок в лизис-буфере при 100 °C и подвергали SDS-электрофорезу в 10 % полиакриамидном геле (ПААГ). Процентное содержание искомого продукта относительно суммарных клеточных белков оценивали с помощью программы Quantity One. Для определения локализации рекомбинантного белка клетки продуцентов разрушали ультразвуком на дезинтеграторе QSonica Q700 в течение 10 мин (40 импульсов по 5 с, 357 Дж с перерывами в 10 с; амплитуда 50) и подвергали электрофорезу растворимую (н/о) и нерастворимую (ос) фракции клеток, разделенные центрифугированием.

Результаты и обсуждение

На основе анализа нуклеотидной последовательности гена VCA0218 (в составе малой хромосомы) *V. cholerae* N16961 (AE003853) нами были сконструированы специфические праймеры для ПЦР-амплификации гена *hlyA* (5'-3'): прямой – TGAGGGATCCATGCCAAAАСТСААТСГТТGC и обратный – CCTGCTGCAGCAGGGCATGCTTCCATТGTT. Поскольку амплификат необходимо было встроить в pQE30 в ориентации, обеспечивающей направление транскрипции под контролем T5-промотора, на 5'-конце каждого праймера был внесен сайт рестрикции для эндонуклеазы, образующей липкие концы: BamHI для прямого праймера и PstI – для обратного (в приведенных последовательностях выделены жирным шрифтом и подчеркнуты) в соответствии с порядком расположения сайтов рестрикции в полилинкере векторной плазмиды.

Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pHlyA показана на рис. 1. На электрофореграмме ее BamHI-PstI-рестрикта присутствовало два фрагмента размерами ~3,5 и ~2,3 т.п.н., что соответствовало таковому вектора и гена *hlyA*. Затем эта плаزمида была трансформирована в несколько штаммов *E. coli*: HB101, C600, BW, Jm101, Jm103, JM109, Stratagen, M15[pREP4]. Тестирование бульонных культур трансформантов, выращенных с ампициллином и индуктором ИПТГ в лунках кровяного агара, показало, что наилучшая продукция гемолизина обеспечивалась клонами штаммов *E. coli* M15[pREP4] pHlyA и Jm103pHlyA, и именно они были выбраны для дальнейшего тестирования.

Как известно, в клетках *E. coli*, в отличие от *V. cholerae*, гемолизин не подвергается протеолити-

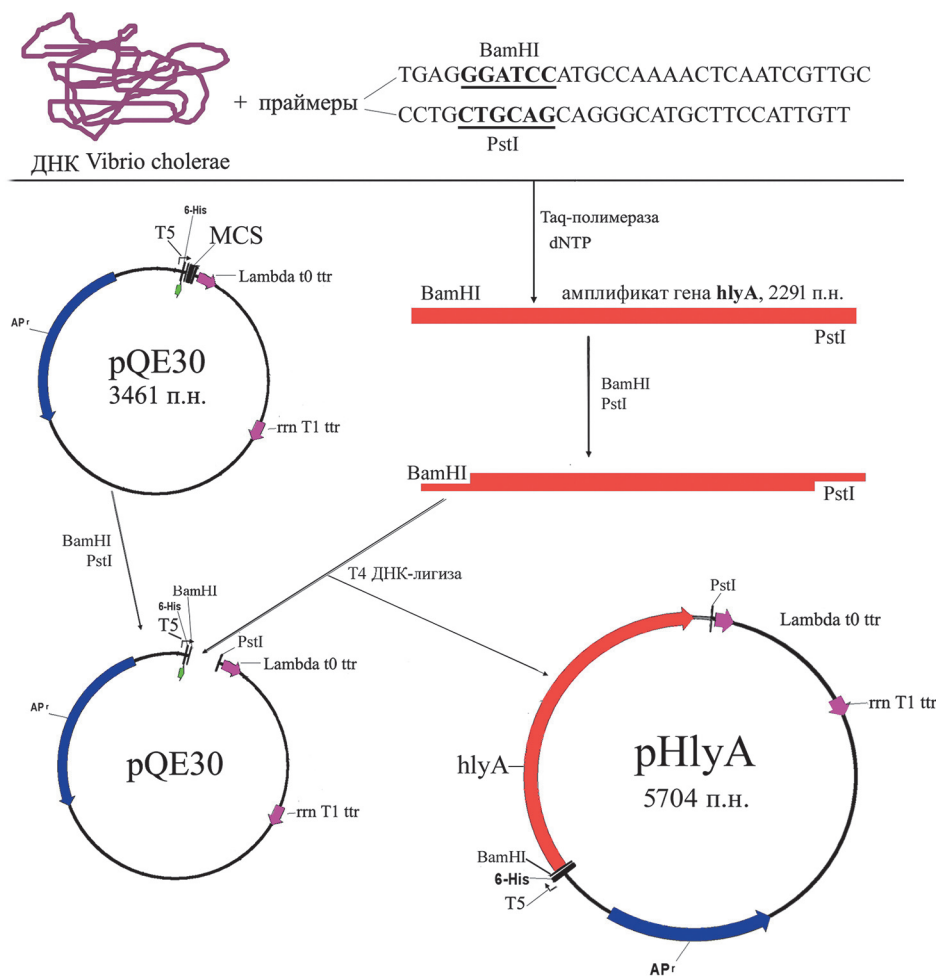


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pHlyA

ческому процессингу и синтезируется в виде прогемолизина (proHlyA) с молекулярной массой (ММ) около 82 кДа, обладающего, тем не менее, гемолитической активностью, хотя и пониженной по сравнению со зрелой формой HlyA (65,6 кДа) [4, 8]. Кроме того, рекомбинантный белок должен содержать на N-конце гексагистидиновый блок (6His-tag) и иметь ММ ~83 кДа. Поэтому после электрофореза лизатов клеток в ПААГ мы фиксировали наличие мажорной полосы в этом диапазоне. Как видно из рис. 2А, значи-

тельное увеличение количества белка с ММ ~83 кДа (соответствующей ММ 6His-proHlyA) наблюдалось только в лизате клеток *E. coli* M15[pREP4]pHlyA, в отличие от таковых Jm103pHlyA и обоих контрольных штаммов, содержащих векторную плазмиду без вставки. По данным программы Quantity One, количество продукта в лизате M15[pREP4]pHlyA составляло ~13 % суммарных клеточных белков. Для определения локализации рекомбинантного белка электрофорезу подвергали растворимую (н/о) и нерастворимую (ос) фракции клеток, разделенных центрифугированием. Искомый белок выявлен в нерастворимой фракции (тельцах включения) штамма M15[pREP4]pHlyA (рис. 2Б), где его содержание составляло ~17 % суммарных клеточных белков.

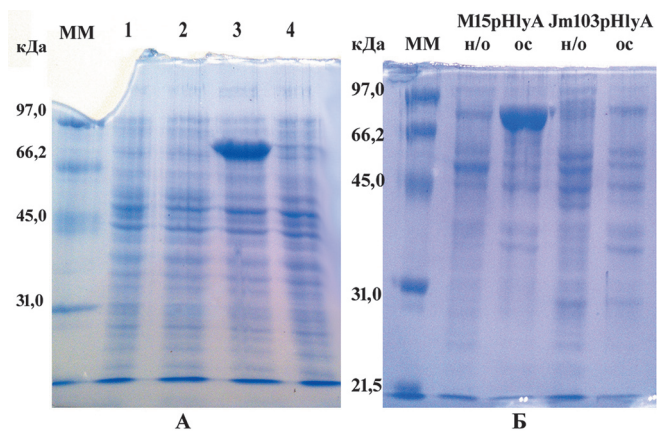


Рис. 2. Продукция proHlyA рекомбинантными штаммами *E. coli*, выращенными с индукцией ИПТГ (SDS-электрофорез в 10 % ПААГ):

А – лизаты целых клеток: 1 – Jm103pQE30, 2 – Jm103pHlyA, 3 – M15[pREP4]pHlyA, 4 – M15[pREP4]pQE30; Б – растворимая (н/о) и нерастворимая (ос) фракции ультразвуковых дезинтеграторов

Таким образом, нами сконструирован штамм *E. coli* – суперпродуцент рекомбинантного белка proHlyA. В случае необходимости получения зрелой формы HlyA с ММ 65 кДа, обладающей повышенной гемолитической и цитолитической активностью, прогемолизин может быть подвергнут протеолитическому процессингу с помощью обработки трипсином либо гемагглютинин/протеазой [4, 8].

Преимуществами полученного продуцента по сравнению с холерными вибрионами является высокий выход искомого белка, отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных биологически активных субстанций, которые могли бы затруднить

его выделение и очистку, возможность культивирования без соблюдения режима работы с возбудителями особо опасных инфекций, а по сравнению с известными рекомбинантными штаммами *E. coli* [1, 2, 6, 7] – непродолжительный период наращивания биомассы (4–6 ч включая индукцию), что обеспечит ускоренное получение препарата.

Штамм *E. coli* M15[pREP4]pHlyA депонирован в ГКПБ «Микроб» под номером КМ 2028.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.П., Монахова Е.В., Ушакова И.Е., Михась Н.К., Данилкина Е.Б., Ломов Ю.М. Гемолизин *Vibrio cholerae* eltor: клонирование и экспрессия генов в *Escherichia coli*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1992; 7–8:14–20.
2. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Гончарова Л.А., Михась Н.К., Непомнящая Н.Б., Асеева Л.Е., Каграманов В.С. Клонирование и экспрессия гена гемагглютинин/протеазы (*hapA*) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli*. *Биотехнология.* 2006; 6:8–15.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
4. Banerjee K.K., Mazumdar B. *Vibrio cholerae* hemolysin: an enigmatic pore-forming toxin. In: T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, eds. Epidemiological and molecular aspects on cholera. Springer Science+Business Media; 2011. P. 277–90.
5. Cinar H.N., Kothary M., Datta A.R., Tall B.D., Sprando R., Bilecen K., Yildiz F., McCardell B. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2010; 5(7):e11558. DOI: 10.1371/journal.pone.0011558.
6. Goldberg S.L., Murphy J.R. Molecular cloning of the hemolysin determinant from *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1984; 160(1):239–44.
7. Manning P.A., Brown M.H., Heuzenroeder M.W. Cloning of the structural gene (*hly*) of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017. *Gene.* 1984; 31:225–31.
8. Nagamune K., Yamamoto K., Naka A., Matsuyama J., Miwatani T., Honda T. In vitro processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/peptidase of *V. cholerae*, trypsin and other proteases. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4655–8.
9. Ruenchit P., Reamtong O., Siripanichgon K., Chaicumpa W., Diraphat P. New facet of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* hemolysin A: a competitive factor for the environmental niche. *FEMS Microbiol. Ecol.* 06 Sept 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix113. [Epub ahead of print].

References

1. Vlasov V.P., Monakhova E.V., Ushakova I.E., Mikhas' N.K., Danilkina E.B., Lomov Yu. M. [Hemolysin of *Vibrio cholerae* El Tor: gene cloning and expression in *Escherichia coli*]. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* 1992; 7–8:14–20.
2. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Goncharova L.A., Mikhas' N.K., Nepomnyashchaya N.B., Aseeva L.E., Kagramanov V.S. [Cloning and expression of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/peptidase gene (*hapA*) in *Escherichia coli*]. *Biotechnology in Russia.* 2006; 6:8–20.
3. Onischenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: "Shiko"; 2013. 560 p.
4. Banerjee K.K., Mazumdar B. *Vibrio cholerae* hemolysin: an enigmatic pore-forming toxin. In: T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, eds. Epidemiological and molecular aspects on cholera. Springer Science+Business Media; 2011. P. 277–90.
5. Cinar H.N., Kothary M., Datta A.R., Tall B.D., Sprando R., Bilecen K., Yildiz F., McCardell B. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2010; 5(7):e11558. DOI: 10.1371/journal.pone.0011558.
6. Goldberg S.L., Murphy J.R. Molecular cloning of the hemolysin determinant from *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1984; 160(1):239–44.
7. Manning P.A., Brown M.H., Heuzenroeder M.W. Cloning of the structural gene (*hly*) of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017. *Gene.* 1984; 31:225–31.
8. Nagamune K., Yamamoto K., Naka A., Matsuyama J., Miwatani T., Honda T. In vitro processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/peptidase of *V. cholerae*, trypsin and other proteases. *Infect. Immun.* 1996; 64(11):4655–8.
9. Ruenchit P., Reamtong O., Siripanichgon K., Chaicumpa W., Diraphat P. New facet of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* hemolysin A: a competitive factor for the environmental niche. *FEMS Microbiol. Ecol.* 06 Sept 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix113. [Epub ahead of print].

Authors:

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Demidova G.V., Nepomnyashchaya N.B. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Непомнящая Н.Б. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 06.02.18.

Принята к публ. 01.03.18.