

Е.В.Клавдиенко, И.В.Тучков, Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, Н.И.Смирнова

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* ПРОДУЦЕНТА ОСНОВНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТОКСИН-КОРЕГУЛИРУЕМЫХ ПИЛЕЙ АДГЕЗИИ ТСРА *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы. Конструирование рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцента белка ТсрА возбудителя холеры Эль Тор, несущего в геноме ген *tcpA^{CIRS}*, и его использование для получения антигена. **Материалы и методы.** В работе использовали нетоксигенный штамм геноварианта *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», а также коммерческие штаммы *Escherichia coli* и плазмиды для клонирования фирмы Invitrogen, США. Хромосомную ДНК из клеток *V. cholerae* выделяли с помощью набора Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit методом нуклеосорбции. Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали набор PureLink Quick Plasmid DNA MiniprepKits. Присутствие гена *tcpA^{CIRS}* определяли в ПЦР, используя рассчитанные нами праймеры. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора PCR Clear-Up-System. SDS-PAGE проводили по методу U.K.Laemmli. Концентрацию белка в пробах измеряли методом М.М.Брадфорд. Для очистки рекомбинантного белка ТсрА применяли набор для аффинной хроматографии. **Результаты и выводы.** Сконструирован безопасный штамм *E. coli* – продуцент рекомбинантного белка ТсрА – основной субъединицы токсин-коррегируемых пилей адгезии возбудителя холеры Эль Тор. Участок гена *tcpA V. cholerae* биовара Эль Тор был клонирован в составе векторной плазмиды pET302 по сайтам рестрикции XhoI-BamHI в штамм *E. coli* BL21(DE3)Star. В этой конструкции биосинтез протеина находится под транскрипционным контролем промотора фага Т7 и индуцируется с помощью изопропил-β-тиогактопиранозидом (ИПТГ). Отработаны условия оптимальной продукции белка ТсрА и схема его очистки с помощью аффинной хроматографии. Показано, что ТсрА присутствует в клетках кишечной палочки как в нативной форме, так и в виде телец включения. Общая продукция белка ТсрА составляет 60 мкг/мл. Полученный очищенный белок ТсрА может быть использован для изучения его иммуногенных и физико-химических свойств, а также для разработки иммунодиагностических препаратов с целью оценки уровня продукции ТсрА у различных штаммов *V. cholerae* и определения антигенного состава холерных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: холерный вибрион, белок ТсрА, клонирование генов, рекомбинантная плаزمид, штамм-продуцент, аффинная хроматография.

Корреспондирующий автор: Клавдиенко Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Klavdienko, I.V.Tuchkov, T.A.Polunina, N.P.Guseva, N.I.Smirnova

Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strain – Producer of Basic Subunit of Toxin-Coregulated Pilus of Adhesion (TCPA) of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to construct recombinant *E. coli* strain – producer of TcpA protein of cholera agent El Tor, carrying *tcpA^{CIRS}* gene in its genome, and use the strains for antigen production. **Materials and methods.** Utilized was non-toxicogenic genovariant strain of *Vibrio cholerae* biovar El Tor from the “State Collection of Pathogenic Bacteria” at the premises of RusRAPI “Microbe”, as well as commercial *E. coli* strains and plasmids for cloning (Invitrogen, USA). Chromosomal DNA from *V. cholerae* cells was extracted using Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit applying nucleosorption. To extract plasmid DNA from *E. coli* cells PureLink Quick Plasmid DNA MiniprepKits were used. The presence of *tcpA^{CIRS}* gene was assayed by PCR, using designed through our own efforts primers. DNA fragments were isolated from agarose gel with the help of PCR Clear-Up-System panel. SDS-PAGE was performed according to U.K.Laemmli method. Protein content of samples was measured by M.M.Bradford method. The panel for affinity chromatography was applied for recombinant TcpA protein purification. **Results and conclusions.** Constructed safe strain of *E. coli* is the producer of recombinant TcpA protein, basic subunit of toxin-coregulated pilus of adhesion of cholera agent biovar El Tor. The region of *tcpA* gene of *Vibrio cholerae* biovar El Tor was cloned as part of vector plasmid pET302 by the restriction sites XhoI-BamHI in *E. coli* strain BL21(DE3)Star. In the stated design protein biosynthesis is under transcriptional control of phage promoter T7 and induced by isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG). Tested were the conditions for optimum TcpA protein production and the layout of its purification using affinity chromatography. It was demonstrated that TcpA is present in cells of intestinal bacterium, both in native form and as inclusion bodies. Overall TcpA protein production amounted to 60 mcg/ml. Obtained purified TcpA protein can be used for studies of its immunogenic and physical-chemical properties, as well as development of immune-diagnostic preparations to evaluate the level of TcpA production in various *V. cholerae* strains, and identification of antigen composition of cholera vaccine preparations.

Key words: cholera vibrio, TcpA protein, gene cloning, recombinant plasmid, producer-strain, affinity chromatography.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Elena V. Klavdienko, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Klavdienko E.V., Tuchkov I.V., Polunina T.A., Guseva N.P., Smirnova N.I. Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strain – Producer of Basic Subunit of Toxin-Coregulated Pilus of Adhesion (TCPA) of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:32–37. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-32-37

Холера – особо опасная инфекция, эпидемии которой регистрируются на территориях многих стран Азии, Африки, Южной Америки. Возникновение эпидемических осложнений по холере в России связано с ее заносами из зарубежных стран, неблагополучных по этой инфекции. Возбудителем текущей седьмой пандемии холеры, с 1961 г. по настоящее время, является *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. К ключевым факторам, определяющим патогенный потенциал возбудителя холеры, относятся холерный токсин (СТ, cholerae toxin), вызывающий основной клинический симптом – профузную диарею, а также токсин-корегулируемые пилы (ТСП, toxin-coregulated pilus), ответственные за колонизацию холерными вибрионами тонкого кишечника человека. Основной субъединицей ТСП является белок ТсрА, кодируемый геном *tcpA* [2]. Структурные гены СТ и ТСП локализованы в геноме возбудителя на двух мобильных элементах – профаге СТХφ и острове патогенности VPI-1 (*Vibrio pathogenicity island*) [3].

ТСП представляют собой пучки из тонких и гибких нитей длиной несколько микрометров и диаметром менее 10 нм, образующих на поверхности клетки длинные тяжи. Каждая нить состоит из гомополимерных повторяющихся белковых субъединиц ТсрА с молекулярной массой 20,5 кДа, которые относятся к IV типу пилей, встречающихся у большинства патогенных грамотрицательных бактерий. С-терминальный регион белка ТсрА образует одну дисульфидную связь, необходимую для стабилизации структуры [6, 15]. Установлено, что ТСП являются не только ключевым фактором патогенности возбудителя холеры, но относятся также к протективным антигенам, ответственным за формирование антиколонизирующего иммунитета при холере. Вследствие иммуногенности этот белок включен в состав многих рекомбинантных холерных вакцин [13, 14]. К настоящему времени установлено, что у возбудителя холеры Эль Тор нуклеотидная последовательность гена *tcpA* представлена двумя основными аллелями: *tcpA^{Elt}* и *tcpA^{CIRS}*. Аллель *tcpA^{Elt}* характерна для типичных штаммов возбудителя, а также геновариантов, вызывавших эпидемии холеры с 1961 по 2002 год. Измененная структура гена *tcpA* (аллель *tcpA^{CIRS}*) обнаружена у высокопатогенных штаммов, изолированных в эндемичных по холере регионах в последующие годы – с 2003 г. и по настоящее время [10]. В отличие от аллели *tcpA^{Elt}*, аллель *tcpA^{CIRS}* несет одну несинонимичную нуклеотидную замену аденина на гуанин (A/G) в положении 266, что приводит к изменению аминокислотной последовательности в белке ТсрА: в позиции 89 аспарагин заменен на серин. Функциональная значимость указанной замены в этом белке пока точно не определена. Тем не менее, широкое распространение геновариантов возбудителя с такой измененной структурой *tcpA* в разных регионах мира за счет вытеснения ими других штаммов возбудителя, а также их занос на территорию России в последние годы определили наш вы-

бор аллели *tcpA^{CIRS}* для создания штамма-продуцента кодируемого ей белка.

К настоящему времени известно о конструировании рекомбинантных штаммов *E. coli* – продуцентов белка ТсрА – рядом зарубежных исследователей для последующего создания на их основе холерных вакцин [9, 12, 13, 14]. Однако в РФ до сих пор отсутствует подобный штамм-продуцент ТсрА, который необходим не только для получения отечественных рекомбинантных холерных вакцин нового поколения, но и для создания иммунодиагностической тест-системы, предназначенной для оценки продукции этого фактора патогенности эпидемически опасными штаммами, поскольку ген *tcpA* относится к генетическим маркерам таких штаммов. Все это указывает на актуальность исследований, направленных на создание эффективных штаммов-продуцентов протективного белка ТсрА.

В настоящее время в основу таких исследований положены достижения генной инженерии, позволяющие использовать экспрессирующие векторные системы, которые определяют возможность получения значительного количества белка с заданными структурно-функциональными характеристиками [12].

Целью нашей работы явилось конструирование рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцента белка ТсрА возбудителя холеры Эль Тор, несущего в геноме ген *tcpA^{CIRS}*, и его использование для получения этого антигена.

Материалы и методы

Донором гена *tcpA^{CIRS}* служил штамм *V. cholerae* M1430 биовара Эль Тор, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», выделенный от больного холерой на территории России (Тверь, 2005 г.). Для трансформации полученных рекомбинантных плазмид использовали коммерческие штаммы *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США) и *E. coli* BL21 StarTM(DE3) (Invitrogen, США). Вектором для клонирования служили плазмиды pCR2.1 и pET302 (Invitrogen, США).

Бактериальные штаммы *V. cholerae*, *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США) и *E. coli* BL21 StarTM (DE3) культивировали на жидкой и агаризованной среде LB (pH 7,4) без антибиотиков или с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). В качестве индуктора экспрессии клонированного гена *tcpA^{CIRS}* использовали изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) (Invitrogen, США).

Хромосомную ДНК из клеток *V. cholerae* M1430 выделяли с помощью коммерческого набора Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen, США) методом нуклеосорбции. Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали коммерческий набор PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kits (Invitrogen, США).

Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

кислотных последовательностей и конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI Suit 9 (Invitrogen, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили как описано ранее [3]. Продукты визуализировали под УФ-светом и фотографировали на гелъ-документирующей системе VersaDoc фирмы (Bio-Rad, США) с использованием программы Quantity One v.4.6.9 (Bio-Rad, США). В качестве контроля молекулярной массы использовали коммерческие маркеры GenRuler™ 100 пн DNALadder (MBI Fermentas, Литва). Присутствие гена *tcpA* определяли в ПЦР, используя рассчитанные нами праймеры (F full ca-aaatggtggagttatat и R full gcttaactgttaccaaaagc), фланкирующие фрагмент длиной 701 п.н.

Плазмидный состав штаммов изучали методом скрининг-электрофореза в агарозном геле [8]. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора PCR Clear-Up-System (Promega, США).

Секвенирование проводили с использованием автоматического секвенатора ABI3500xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. SDS-PAGE электрофорез проводили по методу U.K.Laemmli [10].

Двумерный гелъ-электрофорез осуществляли в ячейках Protean II xi и Protean II xi 2D (Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкции производителя с модификациями [4]. Гели анализировали в мультифункциональной системе гелъ-документирования Syngene с помощью программного обеспечения Dymension (G:BOX Chemi XT4, Великобритания).

Для получения лизатов клеток штамма-продуцента, выращенных в бульоне LB при 37 °C в объеме 50 мл, клетки осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Осадок промывали и обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе циклом озвучивания: 30 с ON, 30 с OFF, 10 раз при частоте 60 кГц на ледяной бане. Для разделения растворимой и нерастворимой фракций белка TsrA образовавшийся клеточный дебрис осаждали при 10000 g в течение 10 мин. Наличие белка в полученных образцах клеточного лизата, осадка и супернатанта контролировали с помощью SDS-PAGE электрофореза.

Концентрацию белка в пробах измеряли методом M.M.Bradford [5].

Для очистки рекомбинантного белка TsrA применяли набор для аффинной хроматографии (Bio-Rad, США), содержащий Ni-NTA агарозу (Qiagen, Германия).

Результаты и обсуждение

Конструирование штамма-продуцента белка TsrA осуществляли в два этапа. На первом был получен безопасный штамм *E. coli*, содержащий пол-

норазмерный хромосомный ген *tcpA*^{CIRS} возбудителя холеры в составе вектора для клонирования. Для этого вначале амплифицировали ген *tcpA*^{CIRS}, используя праймеры (F full и R full), фланкирующие его полную нуклеотидную последовательность со старт- и стоп-кодонами. Матрицей ДНК для амплификации гена *tcpA*^{CIRS} служил штамм *V. cholerae* M1430 биовара Эль Тор. Далее ПЦР-продукты подвергали электрофорезу в 1,5 % агарозном геле. Ампликон размером 701 п.н., соответствующий по молекулярной массе полноразмерному гену *tcpA*^{CIRS}, вырезали и очищали от агарозы на колонках (Centri-Sep Spin Columns Applied Biosystems, США). Далее очищенный ПЦР-продукт клонировали в плазмидном векторе pCR2.1. Плазмидную ДНК и ампликон гена *tcpA*^{CIRS} лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific, Германия) согласно рекомендациям изготовителя, затем методом электропорации лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* TOP10, которые высевали на селективную среду, содержащую ампициллин, хромогенный субстрат X-gal и индуктор ИПТГ для «синей-белой селекции». В отобранных белых колониях *E. coli* TOP10 наличие специфических вставок нуклеотидной последовательности гена *tcpA*^{CIRS} в плазмиде, содержащейся в клетках, подтверждали методом ПЦР с использованием указанных выше праймеров. Последующее секвенирование клонированного участка ДНК в четырех отобранных колониях штамма *E. coli* TOP10 pCR2.1 показало идентичность его нуклеотидной последовательности с таковой *V. cholerae* M1430 лишь у одного клона, который был отобран для дальнейшей работы и обозначен как *E. coli* TOP10 pCR2.1 *tcpA*. Таким образом, получен рекомбинантный штамм *E. coli* TOP10 pCR2.1 *tcpA* IV группы патогенности, содержащий векторную плазмиду с полноразмерным геном *tcpA*^{CIRS} указанного патогена (рис. 1).

На втором этапе работы путем переклонирования гена *tcpA* из плазмиды pCR2.1 *tcpA* в экспрессирующую векторную систему pET302 создан штамм-продуцент этого белка. Вначале получили укороченный фрагмент клонированного гена *tcpA*^{CIRS}, лишённого лидерного пептида, состоящего из 25 аминокислот и альфа-спирали, характерной для всех пилей адгезии IV типа. Для этого использовали метод ПЦР с рассчитанными нами праймерами, имеющими сайты для эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *BamHI* (рис. 1). В результате получили ампликон, который соответствовал фрагменту гена *tcpA*^{CIRS} размером 534 п.н. Далее ДНК выбранной экспрессирующей плазмиды pET302 и ампликон укороченного гена *tcpA*^{CIRS} одновременно расщепляли эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *BamHI* (Thermo Fisher Scientific, Германия) в течение 15 мин, рестриктонные фрагменты лигировали, и смесью лигированных молекул осуществляли трансформацию методом электропорации компетентных клеток *E. coli* BL21 Star™(DE3) согласно стандартным протоколам.

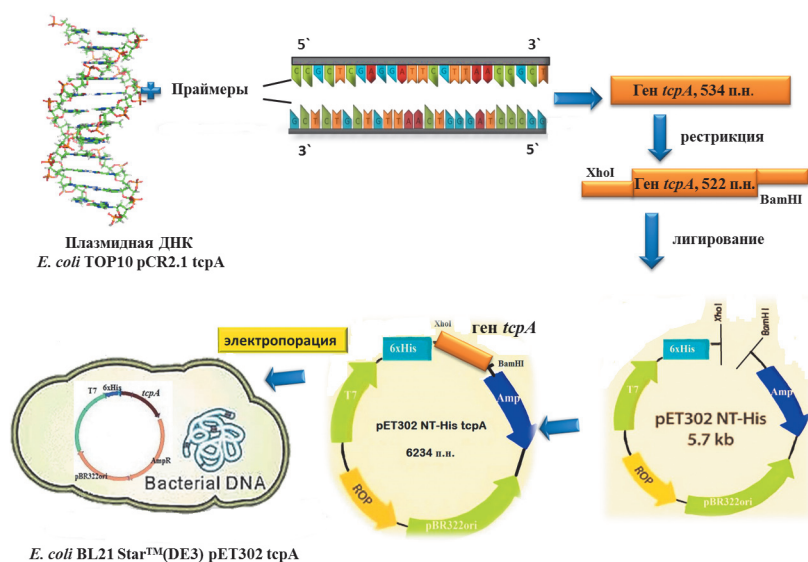


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*

Выбор штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) для экспрессии ТсрА обусловлен тем, что в хромосоме этого штамма присутствуют мутации по гену рибонуклеазы (*rne131*), что снижает уровень деградации мРНК и увеличивает выход белка за счет стабильности процесса транскрипции (синтеза мРНК). Кроме того, мутация гена *ompT* устраняет мембранную протеазу OmpT и уменьшает деградацию экспрессируемых белков. Также в геноме этого штамма интегрирован ген РНК-полимеразы фага Т7 для экспрессии с сильного Т7 промотора [7]. Полученные трансформанты культивировали на LB-агаре, содержащем 50 мкг/мл ампициллина при 37 °С в течение 18–24 ч. Нуклеотидная последовательность гена *tcpA* шести отобранных клонов была секвенирована. Для дальнейшей работы взяли один клон, обозначенный как *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*. Таким образом, был сконструирован штамм *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*, несущий в плазмиде pET302 *tcpA* клонированный участок гена *tcpA*^{CIRS} (534 п.н.), который поставлен под контроль промотора фага, узнаваемого РНК-полимеразой фага Т7. Добавление в среду выращивания рекомбинантного штамма индуктора ИПТГ обеспечивало эффективную продукцию белка ТсрА.

Для изучения экспрессии клонированного фрагмента гена *tcpA*^{CIRS} клетки клона *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* выращивали на агаре LB в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) при 37 °С. Затем две петли ночной культуры ресуспензировали в 2,0 мл бульона LB, культивировали до OD₆₀₀ = 0,6 и вносили в колбы с 50,0 мл LB-бульона (рН 7,4) с добавлением ИПТГ. Для увеличения продукции целевого белка провели ряд экспериментов по выбору условий культивирования штамма-производителя по следующим параметрам: концентрация ИПТГ (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 мМ), время после индукции (2 ч, 3 ч, 4 ч, 6–18 ч) и температура выращивания (30 и 37 °С). Присутствие рекомбинантного белка ТсрА в клетках штамма кишечной палочки оценивали с помощью

12,5 % SDS-PAGE электрофореза. В результате показано, что при выращивании штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* в жидкой среде LB (рН 7,4) в условиях усиленной аэрации (200 об/мин) при температуре 37 °С в течение 2 ч после индукции 0,1 мМ ИПТГ на электрофореграммах в клеточном лизате штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* присутствовала белковая полоса с молекулярной массой ~19,0–20,5 кДа (рис. 2, дорожка 2), которая отсутствовала в лизате клеток, выращенных без индукции, а также у контрольного штамма, содержащего векторную плазмиду. При нанесении осадка и надосадка определено, что белок ТсрА в клетках штамма-производителя присутствует как в нативной растворимой, так и в нерастворимой фракции в виде телец включения (рис. 2, дорожки 3, 4).

На следующем этапе работы получили очищенный белок ТсрА. Наличие в плазмиде pET302 полигистидиновой метки (His-tag) дает возможность

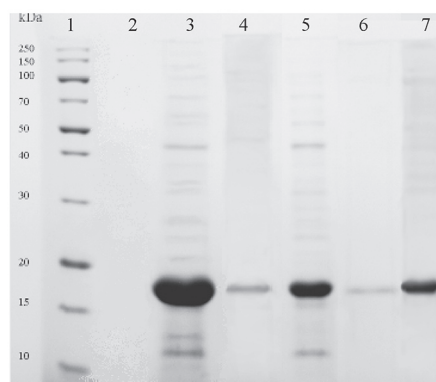


Рис. 2. Анализ продукции белка ТсрА рекомбинантным штаммом методом электрофореза:

1 – маркер молекулярного веса (Invitrogen, США); 2 – отрицательный контроль, штамм *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302; 3 – суммарный клеточный лизат штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* с оптимальной индукцией ИПТГ; 4 – растворимая фракция рекомбинантного белка ТсрА до очистки на колонке; 5 – нерастворимая фракция штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*; 6 – первичная элюция нативной формы белка ТсрА с Ni-NTA агарозы Native Binding Buffer с 250 мМ имидазола; 7 – первичная элюция белка ТсрА после рефолдинга

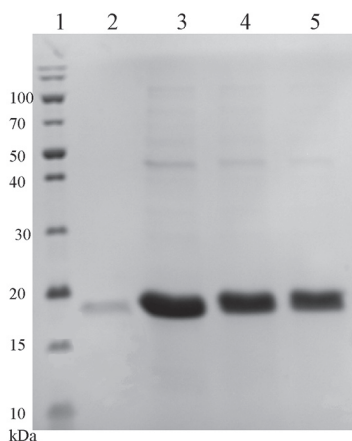


Рис. 3. Электрофореграмма ренатурированной формы рекомбинантного белка TsrA, полученного из штамма продуцента *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tsrA* комбинированным никель-хелатным методом:

1 – маркер молекулярной массы (Invitrogen, США); 2 – образец белка TsrA, полученный нативным методом; 3–5 – первые три элюции ренатурированного белка TsrA после очистки комбинированным методом

выделения и очистки фракций рекомбинантного белка TsrA с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии [1]. Подготовку колонки для металл-хелатной аффинной хроматографии (Bio-Rad, США), а также выделение и очистку фракций белка TsrA в нативных и денатурирующих условиях проводили согласно протоколам.

Для получения растворимой фракции белка TsrA в нативных условиях его супернатант наносили на колонку. Отмывку проводили с помощью буфера Native Wash Buffer, ступенчато повышая в нем концентрацию имидазола: 30 mM (10,0 мл), 50 mM (10,0 мл), 100 mM (10,0 мл) для уменьшения неспецифического связывания с сорбентом загрязняющих белков и повышения чистоты белка TsrA. Элюцию осуществляли с помощью буфера Native Elution Buffer с 250 mM имидазола. Фракции собирали в стерильные пробирки «Эппендорф» и анализировали на наличие белка с помощью SDS-PAGE электрофореза. Такая очистка позволила получить электрофоретически гомогенный белок TsrA (рис. 2, дорожки 5, 6).

После оптимизации уровня экспрессии TsrA показано, что этот рекомбинантный белок синтезировался в клетках штамма-продуцента в растворимой форме. Однако основное его количество находилось в осадке в виде телец включения, на что указывали результаты SDS-PAGE электрофореза. Тельца включения представляют собой частицы, состоящие из агрегатов рекомбинантного белка в денатурированном неактивном состоянии, что осложняет его последующее выделение и очистку. Для устранения этой проблемы и восстановления присущей белку конформации осадок подвергли процессу рефолдинга.

Для получения белка TsrA из телец включения использовали комбинированный метод очистки на колонках с никелем согласно протоколу набора ProBond (Invitrogen, США). Суть метода заключалась в приго-

товлении лизата и колонок в денатурирующих условиях, а проведение отмывки и элюции с использованием буферов – для нативного метода. Фракции белка после очистки собирали в стерильные пробирки и анализировали с помощью SDS-PAGE электрофореза (рис. 3, дорожки 3–5). Исследования полученных растворимых фракций рекомбинантного белка TsrA в нативных и комбинированных условиях показали, что все образцы целевого продукта идентичны и представляют собой электрофоретически гомогенный белок. Изучение белка TsrA 2D-электрофорезом на коммерческих IPG-стрипах (BioRad, США) показало, что белок TsrA фракционировался в пределах градиента pH 5–7 в виде группы белковых пятен с молекулярной массой 17,0–20,5 кДа.

Общая продукция рекомбинантного белка TsrA, определенная методом М.М. Bradford [5], составляла 60 мкг/мл.

Таким образом, сконструирован безопасный штамм *E. coli* – продуцент рекомбинантного белка TsrA (60 мкг/мл) – основной субъединицы TSP-геновариантов возбудителя холеры Эль Тор. Отработаны условия оптимальной продукции белка TsrA и схема его очистки с помощью аффинной хроматографии на колонках с никель-хелатным сорбентом. Этот метод позволяет получать очищенный препарат рекомбинантного белка TsrA, который может быть использован для изучения его иммуногенных и физико-химических свойств, а также для последующей разработки на его основе иммунодиагностических препаратов с целью оценки уровня продукции TsrA у различных штаммов *V. cholerae* и определения антигенного состава холерных вакцинных препаратов.

Авторы приносят глубокую благодарность лаборанту-исследователю отдела микробиологии Н.В.Котовой за помощь в работе.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кельдиева О.А., Гладилович В.Д., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение. *Научное приборостроение*. 2013; 23(1):74–85.
2. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.
3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
4. Полунина Т.А., Варшавская Ю.С., Заднова С.П., Краснов Я.М. Применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:97–101.
5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.
6. Craig L., Taylor R.K., Pique M.E., Adair B.D., Arvai A.S., Singh M., Lloyd S.J., Shin D.S., Getzoff E.D., Yeager M., Forest K.T., Tainer J.A. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol. Cell*. 2003; 11(5):1139–50. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00170-9.
7. Grunberg-Manago M. Messenger RNA Stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev.*

Genet. 1999; 33:193–227.

8. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73.

9. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G., Alikhani M.Y., Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 6(2):68–73.

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

11. Matreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2013; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

12. Molaee N., Mosayebi G., Amozande-Nobaveh A., Soleyman M.R., Abtahi H. Evolution of the immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. *J. Immunol. Res.* 2017:2412747. DOI: 10.1155/2017/2412747.

13. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(12):e3356. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003356.

14. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F., Manohar J., Harris J.B., LaRocque R.C., Qadri F., Calderwood S.B., Taylor R.K., Ryan E.T. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006; 74:5834–9. DOI: 10.1128/IAI.00438-06.

15. Sun D., Lafferty M.J., Peek J.A., Taylor R.K. Domains within the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilin subunit that mediate bacterial colonization. *Gene.* 1997; 192(1):79–85. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00007-3.

References

1. Kel'tsiyeva O.A., Gladilovich V.D., Podol'skaya E.P. [Metal-affinity chromatography. Fundamentals and application]. *Nauch. Priborostroenie.* 2013; 23(1):74–85.

2. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutuyev V.V. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.

3. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements of natural cholera agent strains]. *Genetika.* 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.

4. Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. [Application of 2-D electrophoresis for the construction of "protein profiles" of bacterial cultures lysates of particularly dangerous infections agents]. *Probl. Osobo opasn. Infek.* 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.

6. Craig L., Taylor R.K., Pique M.E., Adair B.D., Arvai A.S., Singh M., Lloyd S.J., Shin D.S., Getzoff E.D., Yeager M., Forest K.T., Tainer J.A. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol. Cell.* 2003; 11(5):1139–50. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00170-9.

7. Grunberg-Manago M. Messenger RNA Stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* 1999; 33:193–227.

8. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73.

9. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G., Alikhani M.Y., Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 6(2):68–73.

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

11. Matreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2013; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

12. Molaee N., Mosayebi G., Amozande-Nobaveh A., Soleyman M.R., Abtahi H. Evolution of the immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. *J. Immunol. Res.* 2017:2412747. DOI: 10.1155/2017/2412747.

13. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(12):e3356. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003356.

14. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F., Manohar J., Harris J.B., LaRocque R.C., Qadri F., Calderwood S.B., Taylor R.K., Ryan E.T. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006; 74:5834–9. DOI: 10.1128/IAI.00438-06.

15. Sun D., Lafferty M.J., Peek J.A., Taylor R.K. Domains within the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilin subunit that mediate bacterial colonization. *Gene.* 1997; 192(1):79–85. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00007-3.

Authors:

Klavdienko E.V., Tuchkov I.V., Polunina T.A., Guseva N.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Полунина Т.А., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 22.05.17.