

Kazlouski I.S.

Master of Biol. Sci., researcher,
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

Solovjeva A.V.

Master of Biol. Sci., junior researcher,
Institute of Experimental Veterinary, Minsk, Republic of Belarus

Zinchenko A.I.

D. Sc. (Biology), head of laboratory,
Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences

Novikova O.N.

Ph.D. in veterinary, leading researcher,
Institute of Experimental Veterinary, Minsk, Republic of Belarus

Lomako Y.V.

Ph.D. in veterinary, director of institute,
Institute of Experimental Veterinary, Minsk, Republic of Belarus

CONSTRUCTION OF STRAIN PRODUCING A SUBUNIT OF ESCHERICHIA COLI THERMOLABILE TOXIN

Казловский И.С.

магистр биологических наук, научный сотрудник,
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Соловьева А.В.

магистр биологических наук, младший научный сотрудник,
Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского,
г. Минск, Республика Беларусь

Зинченко А.И.

доктор биологических наук, заведующий лабораторией,
Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси

Новикова О.Н.

кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник,
Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского,
г. Минск, Республика Беларусь

Ломако Ю.В.

кандидат ветеринарных наук, директор института,
Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского,
г. Минск, Республика Беларусь

СОЗДАНИЕ ШТАММА, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО СУБЪЕДИНИЦУ ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА ESCHERICHIA COLI

Summary. Colibacteriosis is an acute zoonotic disease manifested by septicaemia, toxemia, enteritis, dehydration of the body and damage of the central nervous system. Enterotoxigenic strains of *E. coli* occupy one of the leading places in the etiological structure of calf colibacteriosis in many livestock farms of the Republic of Belarus. As a result of the work, we have created a new strain of *E. coli* 42eLTB - the producer of the recombinant subunit B of the thermolabile toxin of the enterotoxigenic strain *E. coli*. The producing capacity of the obtained strain is 480 mg with 1 L of culture liquid, which exceeds already known strains by 1.37 times.

Аннотация. Колибактериоз – это остро протекающая зоонозная болезнь, проявляющаяся септициемией, токсемией, энтеритом, обезвоживанием организма и поражением центральной нервной системы. Энтеротоксигенные штаммы *E. coli* занимают одно из ведущих мест в этиологической структуре колибактериоза телят во многих животноводческих хозяйствах Республики Беларусь. В результате выполнения работы нами создан новый штамм *E. coli* 42eLTB – продуцент рекомбинантной субъединицы В термолabile токсина энтеротоксигенного штамма *E. coli*. При этом продуцирующая способность полученного штамма составляет 480 мг с 1 л культуральной жидкости, что превышает уже известные штаммы в 1.37 раз.

Key words: *Escherichia coli*, thermolabile toxin, colibacteriosis, genetic engineering

Ключевые слова: *Escherichia coli*, термолabile токсин, колибактериоз, генная инженерия

Введение. Основными факторами отела кишечника, а также способность к вирулентности энтеропатогенных штаммов *E. coli* продукции термолabile [1, 2] и являются факторы адгезии, способствующие термостабильного энтеротоксинов. колонизации бактериями энтероцитов тонкого Термолabile (LT) и/или термостабильные

энтеротоксины вызывают секрецию энтероксинами жидкости и электролитов, что сопровождается водянистой диареей, истощением и гибелью человека или животного.

Термолabileный токсин *E. coli* функционально аналогичен холерному токсину и состоит из пяти В-субъединиц и одной активной субъединицы А. Субъединица В энтеротоксина *E. coli* (далее субъединица В) облегчает проникновение в клетку субъединицы А, которая активирует аденилатциклазу. Затем происходит увеличение концентрации цАМФ, что приводит к повышению секреции хлоридов и воды и уменьшению реабсорбции внутрь клетки ионов натрия. В просвете кишечника скапливается жидкость и развивается диарейный синдром.

Из анализа литературных данных последних лет [3] следует вывод о том, что перспективным направлением инноваций в разработке вакцин для профилактики болезней, вызванных энтеропатогенными и энтеротоксигенными штаммами *E. coli* является включение в их состав факторов вирулентности и, в первую очередь, токсидов термолabileного токсина.

Таким образом, включение в состав поливалентных вакцин для профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят термолabileного анатоксина *E. coli* может существенно повысить профилактический эффект вакцинации и экономический эффект от их применения.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы служило создание штамма-продуцента рекомбинантной субъединицы В термолabileного токсина *E. coli* для последующего использования в специфической профилактике желудочно-кишечных бактериальных инфекций крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования.

Источником гена субъединицы В (*eLTB*) служила ДНК бактерий *E. coli* O157:H7, выделенная из бактериальной биомассы с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе последовательностей гена субъединицы В. На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42a+ (Novagen, США). На втором этапе линеаризовали плазмиду pET42a+ методом ПЦР с использованием Diamant-ДНК-полимеразы (Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь). На третьем этапе собирали линеаризованный вектор и целевые гены методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-

ПЦР) [4]. На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы фрагменты, полученные на первых двух этапах, в эквимольных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue (Novagen) с последующим высевом на плотную селективную питательную среду LB с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

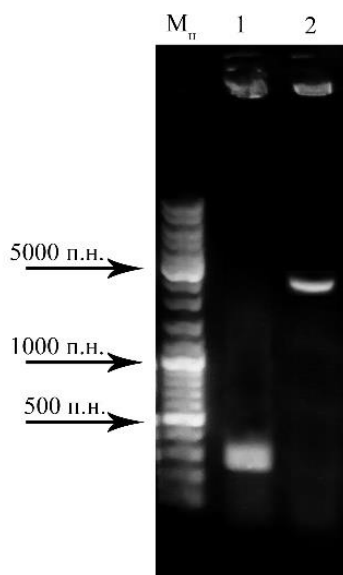
Рестрикционный и ПЦР-анализ полученных клонов осуществляли по стандартным методикам. Результаты визуализировали с помощью электрофореза и обрабатывали с использованием системы гель-документирования и программного обеспечения BioRad. Секвенирование клонов проводили при помощи автоматизированной системы генетического анализа Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ (BeckmanCoulter, США).

Из полученных трансформантов при помощи щелочного лизиса выделяли плазмиды, которые в дальнейшем использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3). Клетки-трансформанты выращивали в среде LB с канамицином (80 мкг/мл) до оптической плотности КЖ 0.6 ($\lambda = 600$ нм), затем индуцировали синтез белка 0.5 mM изопропил- β -тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Анализ процентного содержания целевого белка осуществляли, используя программу ImageLab (BioRad, США).

По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 8.0), содержащем 300 mM NaCl и 20 mM имидазол. Ультразвуковую дезинтеграцию клеток проводили в приборе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0.05 кВт; температура – 4°C; продолжительность – 600 импульсов по 0.5 с. Клеточный лизат освещали центрифугированием при 60 000 g в течение 30 мин. Осадок, содержащий «тела включения», отмывали 8 M раствором мочевины в течение 2 ч и подвергали центрифугированию. Супернатант наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni-NTA (Qiagen, США). Белок элюировали 50 mM Na-фосфатным буфером (pH 8.0), содержащим 300 mM NaCl и 500 mM имидазол. Полученные в результате аффинной хроматографии образцы анализировали с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и диализовали против против 100-кратного объема 50 mM Трис-HCl-буфера (pH 8.0), содержащего 100 mM NaCl.

Результаты и обсуждение.

Последовательность гена *eLTb* длиной 372 п.о. выделили из геномной ДНК *E. coli* O157:H7 при помощи ПЦР. Затем проводили линеаризацию вектора pET-42a(+) длиной 4976 п.о. Полученные амплификаты анализировали при помощи 1.5% агарозного гель-электрофореза (рис. 1).



M_n (здесь и далее) – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК.

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена *eLTb* (1) и вектора *pET42a(+)* (2)

При постановке ПП-ПЦР в реакцию смесь вносили эквимольное количество линейаризованного вектора *pET42a* и очищенного гена *eLTb*. Полученной ПЦР смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue (ThermoFisher, США).

ДНК, полученная из колоний бактериальных клеток, в дальнейшем подвергли ПЦР-анализу для

подтверждения наличия целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры к последовательности Т7-терминатора и к последовательности, кодирующей целевой белок. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены на рис. 2.

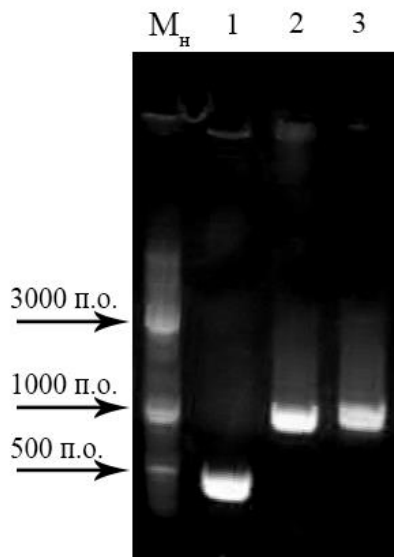


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, изолированной из трех колоний, образованных клетками-трансформантами

Из данной электрофореграммы следует, что только в одной из трех колоний присутствует ген *eLTb* в правильной ориентации. Такая колония была выбрана для дальнейшей работы.

Из выбранного штамма-трансформанта выделили плазмиду при помощи щелочного лизиса. Выделенную кольцевую молекулу проверили рестрикционному анализу по сайту узнавания рестриктазы *HindIII* и секвенированием, для подтверждения факта отсутствия нежелательных

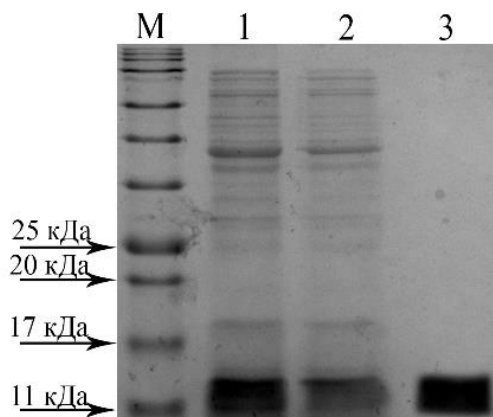
спонтанных мутаций, появившихся в гене субъединицы В. По результатам этих анализов был сделан вывод о том, что полученная линейная молекула ДНК соответствует теоретически рассчитанной массе – 5386 п.о. и полинуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу В, совпадает с первоначальной последовательностью гена *eLTb*.

Полученной ранее плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli*

BL21 (DE3). В результате был создан штамм *E. coli* 42eLTB – продуцент рекомбинантной термолабильной субъединицы В токсина *E. coli*, молекула которого содержит дополнительный октагистиридиновый олигопептид на С-конце.

При экспрессии белка в полученном штамме с применением 0.5 мМ ИПТГ доля целевого белка с

молекулярной массой около 15 кДа (что соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе субъединицы В токсина) составляет 81.2 % от общего клеточного белка (рис. 3).



М – положение и молекулярные массы (кДа) стандартных белков.

Рис. 3 – Электрофоретический анализ белкового состава клеток *E. coli* 42eLTB: общий клеточный белок (1), нерастворимая фракция (2) и очищенный белковый препарат термолабильной субъединицы В токсина *E. coli* (3)

Продуцирующая способность штамма *E. coli* 42eLTB составила 480 мг белка с 1 л КЖ. По сравнению с максимальной продуцирующей способностью штамма *Bacillus brevis* HPD31 pNU212-LTB известным из литературных источников [5], продуцирующая способность штамма превышает над известным в 1.37 раз.

Следует подчеркнуть, что введение в рамку считывания гена дополнительного олигонуклеотида, кодирующего октагистиридиновый олигопептид на С-конце, позволило в одну стадию получить препарат белка, чистота которого составила более 97 %. В результате, после очистки с помощью хроматографии и последующего концентрирования белка путем постановки диализа из 200 мл КЖ было получено 25 мг белка с выходом 26 %.

Заключение. Впервые сконструирована генетическая конструкция, включающая в себя ген субъединицы В термолабильного токсина *E. coli*, выделенный методом ПЦР и встроенный в вектор pET42a(+). Созданной конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* BL21 (DE3), что привело к созданию нового рекомбинантного штамма *E. coli* 42eLTB – продуцента рекомбинантной субъединицы В термолабильного токсина *E. coli*, содержащая октагистиридиновый олигопептид на С-конце молекулы. Такая первичная структура антигена позволяет выделять его из клеточного лизата в одну стадию с использованием металлоаффинной хроматографии

на смоле Ni-NTA. Продуцирующая способность полученного нового штамма *E. coli* 42eLTB составила 480 мг белка с 1 л КЖ, что превышает известный штамм-продуцент в 1.37 раз.

Литература:

1. Sospedra I., Simone C., Soriano J.M. et al. Characterization of heat-labile toxin-subunit B from *Escherichia coli* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Food Chem. Toxicol.* 2012. Vol. 50. P. 3886–3891.
2. Loc N.H., Tung N.V., Kim P.T., Yang M.S. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin b subunit in *Centella (Centella Asiatica) Urban* via biolistic transformation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2020. Vol. 21, № 10. P. 973–979.
3. Hur J., Tao C., He Y. A 2018 workshop: vaccine and drug ontology studies (VDOS 2018). *BMC Bioinformatics.* 2019. Vol. 20, Suppl. 21. Art. 705.
4. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, № 7. Art. e6441.
5. Kozuka S., Yasuda Y., Isaka M. Efficient extracellular production of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit by using the expression/secretion system of *Bacillus brevis* and its mucosal immunoadjuvanticity. *Vaccine.* 2000. Vol. 18, № 17. P. 1730–1737.