



УДК 547.963.320.57 : 577.214.622

© 1992 г.

А. В. Миккульскис, Т. И. Доморадская, С. А. Филиппов,
В. Н. Добрынин, В. Г. Коробко

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИНА *Escherichia coli*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Осуществлено клонирование гена термостабильного энтеротоксина (*estA*) *Escherichia coli*. Методом блот-гибридизации по Саузерну показано, что в штамме *E. coli* SA162 ген *estA* локализован на хромосоме. С помощью полимеразной цепной реакции осуществлен сайт-направленный мутагенез гена и получен рекомбинантный штамм — продуцент термостабильного энтеротоксина.

Энтеротоксигенные линии *Escherichia coli* (ЕТЕС), способные вызывать диарею у животных и людей, секретируют токсины, которые первоначально были охарактеризованы по их стабильности к нагреванию. Устойчивые к термической обработке токсины *E. coli* называются термостабильными энтеротоксинами (ST), а неустойчивые — термолабильными энтеротоксинами (LT) [1]. Существуют, по крайней мере, две группы различающихся по биологическим и химическим свойствам термостабильных энтеротоксинов. Эти токсины, обозначаемые ST_I или ST_a и ST_{II} или ST_b, различаются по аминокислотной последовательности и структуре кодирующих их генов *estA* и *estB* соответственно [2, 3]. Зрелые секретируемые токсины первой группы состоят из 18 или 19 аминокислотных остатков (AK) и обозначаются ST_h и ST_r, где индексы h и r указывают на то, что они первоначально были обнаружены в изолятах ЕТЕС человеческого и свиного происхождения. Оба пептида имеют почти одинаковую структуру на карбоксильном конце [4].

К настоящему времени определены нуклеотидные последовательности четырех аллелей *estA* из разных источников энтеротоксигенных *E. coli* [2, 5–7]. Если гены *estA3* и *estA4* совпадают по своей структуре [3], то структуры генов остальных аллелей могут иметь до 30% различий, а соответствующие им аминокислотные последовательности — до 38% [1]. Очень богатое содержание А·Т-пар в гене ST_I (около 70%) свидетельствует о том, что последний был импортирован в *E. coli* (где А·Т-пары составляют около 50%) из другой бактерии [1]. С этой точки зрения большой интерес представляют нуклеотидные последовательности не только кодирующей части энтеротоксина, но и прилегающих к ней районов. Как было показано в случае аллели гена *estA1*, последний включал в себя полностью или частично инвертированные повторы IS1 и IS30 [1, 5, 7], что говорит о возможной транспозонной локализации генов ST_I. Для энтеротоксигенных линий *E. coli* животного происхождения, как прави-

В работе использовали только олигодезоксирибонуклеотиды, поэтому префикс «d» для краткости опущен.

Сокращения: PCR — полимеразная цепная реакция; буфер TE — 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ EDTA; буфер TBS — 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl; БСА — бычий сывороточный альбумин; среда LB — 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl; раствор Денхардта — 0,02% БСА, 0,02% фикоил, 0,02% поливинилпирролидон.

ло, наблюдается правильная структура транспозона Tn1681 [5, 7]. В патогенной для человека линии *E. coli* 18D 5'-нетранслируемая область гена STI тоже содержит IS-элементы [1]. В остальных известных аллелях *estA* подобные структуры не наблюдались [3, 6]. Таким образом, несмотря на отдельные различия, в целом прослеживается существенное сходство между термостабильными энтеротоксинами *E. coli*, что свидетельствует о едином источнике их происхождения. Будучи расположен в мобильной транспозонной структуре, ген *estA* мог легко «перемещаться» в процессе эволюции по геномам бактерий и, возможно, инфицирующих их фагов.

В бактериальной клетке STI синтезируется в виде предшественника длиной в 72 АК, состоящего из трех участков: сигнального пептида, пропоследовательности и зрелого секретлируемого токсина [5, 8]. Хотя роль пропоследовательности в созревании и транспорте зрелого токсина во внешнюю среду пока не совсем ясна, представляет значительный интерес использование этих регуляторных участков для конструирования искусственных генов, кодирующих относительно короткие пептиды (например, антигенные детерминанты), и исследование их экспрессии и возможной секреции продуктов во внеклеточную среду.

В настоящей работе мы описываем выделение и клонирование гена термостабильного энтеротоксина из штамма *E. coli* SA162, определение его нуклеотидной последовательности и получение рекомбинантного штамма *E. coli* — продуцента STI.

Девять природных энтеротоксигенных штаммов *E. coli* из коллекции ВНИИПМ были проверены на содержание гена *est* гибридизацией колоний *in situ* со специфическими олигонуклеотидными зондами (I—IV).

27	33	63	70
SerSerLysGluLysIleThr		CysCysAsnProAlaCysAlaGly	
TCTTCAAAACAGAAAATTACA		TCTTCTAATCCTGCTTGTGCTGG	
A C		G G G	
(I)		(II)	
63	70	63	70
CysCysTyrProAlaCysAlaGly		CysCysAsnProAlaCysThrGly	
TCTTGTATCCTGCTTGTGCTGG		TCTTCTAATCCTGCTTGTACTGG	
G G		G G	
(III)		(IV)	

Структура олигонуклеотидов для гибридизации была выведена на основе аминокислотных последовательностей термостабильных метанолрастворимых энтеротоксинов и известных нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов. Олигонуклеотидный зонд (I) выбран из области, кодирующей аминокислотную последовательность 27—33 предшественника, тогда как зонды (II)—(IV) кодируют С-концевую часть зрелого пептида. На первом этапе проводили гибридизацию с каждым отдельным зондом. При этом оказалось, что наиболее ярко выраженные сигналы были получены с олигонуклеотидами (III) и (IV). Поэтому в дальнейших экспериментах использовали смесь этих олигонуклеотидов. Из 9 исследованных штаммов четыре давали четкий сигнал при гибридизации, и один (*E. coli* SA162) был подвергнут дальнейшему изучению. Следует отметить, что во всех исследованных до сих пор случаях ген *estA* был локализован в плазмидной ДНК. Поэтому с целью идентификации гена *estA* была выделена суммарная плазмидная ДНК из клеток *E. coli* SA162 и полученные препараты проанализированы электрофорезом в 1% агарозном геле. Анализ показал, что клетки бактерий содержали несколько плазмид разного размера. Однако блот-гибридизация по Саузерну со

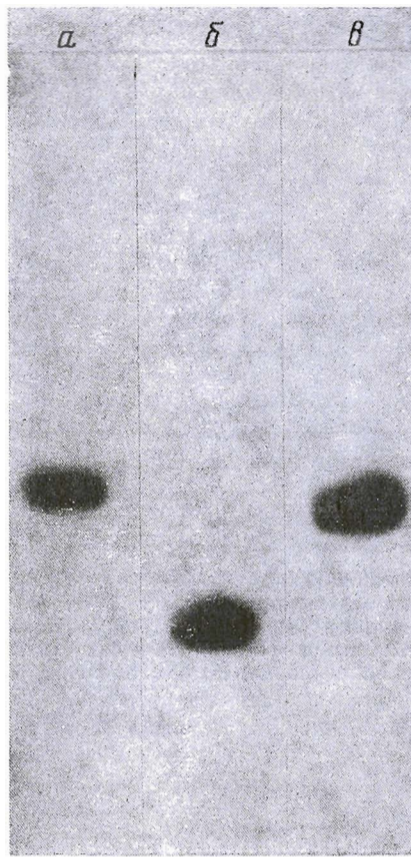


Рис. 1. Саузерн-блоттинг гидролизатов хромосомной ДНК *E. coli* SA162 рестриктазами *PvuII* (а), *MspI* (б) и *PstI* (в)



Рис. 2. Схема секвенирования фрагмента хромосомной ДНК *E. coli* SA162 и амплификации структурного гена *est*. Pr_{mix} — смесь олигонуклеотидов III и IV; Pr_V , Pr_{VI} и Pr_{VII} — олигонуклеотидные праймеры V, VI и VII соответственно

смесью олигонуклеотидов (III) и (IV) показала, что ни одна из плазмид не содержит гена *estA*, что приводит к предположению о хромосомной локализации этого гена в исследуемом штамме. Для проверки этого предположения мы выделили хромосомную ДНК и провели блот-гибридизацию по Саузерну после расщепления изолированной хромосомной ДНК эндонуклеазами рестрикции *PvuII*, *HpaII* и *PstI* (рис. 1). Для дальнейшей работы был выбран *PstI*-фрагмент ДНК *E. coli* SA162 величиной около 1,7 т. п. о., который был клонирован в плазмиду рSP64 по сайту *PstI*. Отбор клонов, содержащих целевую плазмиду рSPST1, проводили гибридной колонией со «смесевым» олигонуклеотидным зондом.

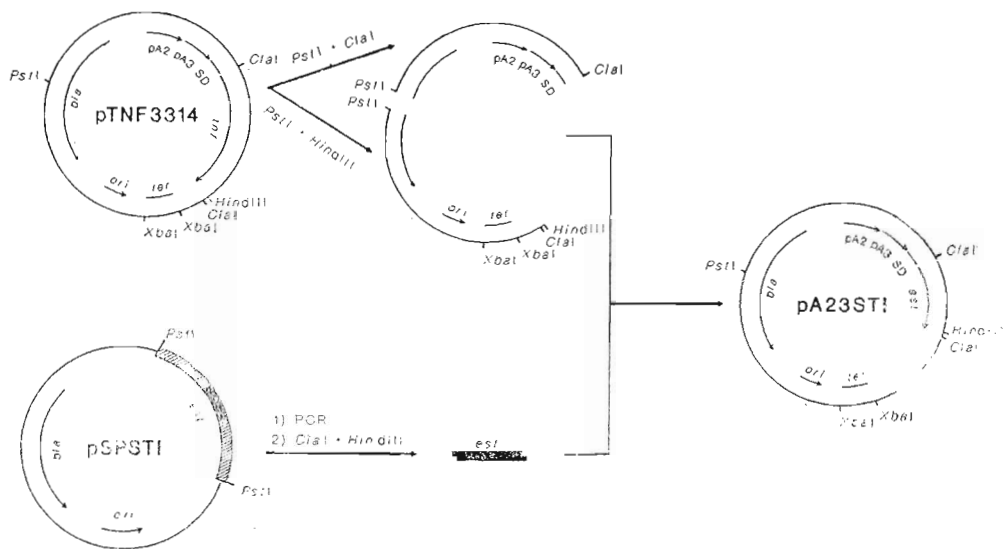


Рис. 3. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pA23STI. *ori* – репликон типа ColEI; *ter* – терминатор транскрипции фага λ ; *bla* – ген β -лактамазы, *tnf* – ген фактора некроза опухолей человека; *est* – ген термостабильного энтеротоксина; pA2 и pA3 – промоторы A2 и A3 бактериофага T7; SD – синтетическая последовательность Шайна-Дальгарно; PCR – амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции

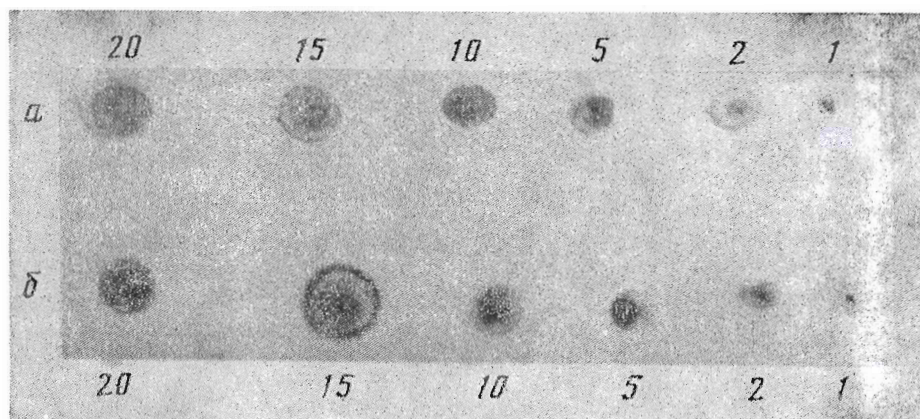


Рис. 4. Иммуно-дот-блоттинг с поликлональными антителами против синтетического термостабильного энтеротоксина *E. coli*. Колонка *a* – нанесен супернатант клеток *E. coli* SG20050, содержащий плазмиду pA23STI (мкл); колонка *b* – нанесен синтетический STI (мкг)

Нуклеотидную последовательность вставки определяли по методу Сэнгера, адаптированному для PCR [9], используя двухцепочечную ДНК плазмиды pSPSTI в качестве матрицы и смесь 5'-³²P-меченых олигонуклеотидов (III) и (IV) в качестве затравки (рис. 2). Таким образом была определена нуклеотидная последовательность 3'-нетранслируемой области гена *estA*. Для определения первичной структуры самого гена и регуляторных участков был синтезирован праймер ACATATAATATAGAGGGAATCAAAT (V), комплементарный участку смысловой цепи, рас-

положенному примерно на расстоянии около 20 нуклеотидов за терминирующим кодоном (рис. 2). В результате определена последовательность около 900 нуклеотидов, включающая структурный ген *estA*, 5'-регуляторную и 3'-нетранслируемую области. Компьютерный анализ определенной нами последовательности показал полное ее совпадение с установленной ранее структурой гена *estA* в составе транспозона Tn1681 [5].

Для конструирования рекомбинантной плазмиды для прямой экспрессии клонированного нами гена *estA* в качестве вектора использовали плазмиду pTNF3314 [10]. Эта плазида содержит тандем сильных промоторов транскрипции A2 и A3 ранней области бактериофага T7, синтетический участок инициации трансляции и подходящие для клонирования сайты рестриктаз *ClaI* и *HindIII*. Структурный ген *estA* выделяли из плазмиды pSPSTI и мутагенизировали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров CATCGAATCGATATGAAAAAGCTAATGTTGGC (VI) и CTCTATGAAGCTTAATAACATCCAGCACAGGC (VII). Полученный после амплификации фрагмент ДНК для генерации «липких» концов гидролизовали смесью рестриктаз *ClaI* и *HindIII* и клонировали в плазмиду pTNF3314, как описано в «Экспериментальной части» (рис. 3). В результате получили новую плазмиду pA23STI, структуру которой подтверждали рестриктазным анализом и определением нуклеотидной последовательности вставки.

Для изучения экспрессии гена *estA* плазмидой pA23STI трансформировали компетентные клетки *E. coli* SG20050 (*lon*⁻). Наличие термостабильного энтеротоксина в культуральной жидкости проверяли при помощи иммуно-дот-блоттинга, а также по биологической активности на мышак-сосунках. На рис. 4 приведены результаты иммуно-дот-блоттинга с помощью поликлональных антител против синтетического термостабильного энтеротоксина. Биологическое тестирование супернатанта культуры клеток *E. coli* SG20050, содержащих плазмиду pA23STI, показало его активность при разбавлении 1/128, что свидетельствует о высоком уровне экспрессии гена *estA* в полученном штамме-продуценте (ср. [11]).

Таким образом, осуществлено клонирование гена термостабильного энтеротоксина; установлено, что в природном штамме энтеротоксигенной *E. coli* SA162 бычьего происхождения этот ген локализован на хромосоме в составе транспозона Tn1681. Сконструирована плазида pA23STI, обеспечивающая высокий уровень биосинтеза секретируемого в культуральную среду пептида STI. Полученный штамм может быть использован для препаративного получения термостабильного энтеротоксина.

Сконструированные в данной работе плазмиды pSPSTI и pA23STI, содержащие ген термостабильного энтеротоксина STI, могут быть использованы для получения ДНК-зондов при тестировании энтеротоксигенных штаммов родственных *E. coli* бактерий, таких, как *Yersinia enterocolitica* и *Klebsiella pneumoniae*.

Авторы выражают благодарность А. Т. Кожичу (Институт биоорганической химии АН СССР, Москва) за образец синтетического термостабильного энтеротоксина и А. П. Брылину (Институт экспериментальной ветеринарии, Москва) за кроличью антисыворотку против синтетического термостабильного энтеротоксина.

Экспериментальная часть

В работе использованы dNTP (Boehringer Mannheim, ФРГ), [γ -³²P]ATP (Amersham, Англия); рестриктозные эндонуклеазы *ClaI*, *HindIII*, *MspI*, *PvuII* и ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* НПО «Фермент» (Вильнюс); ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага T4 выделяли по способу, опубликованному в работе [12]. Поликлональные кро-

лищбы антитела против синтетического термостабильного энтеротоксина *E. coli* получены из Института экспериментальной ветеринарии; образец синтетического термостабильного энтеротоксина получен из Лаборатории химии пептидов ИВХ им. М. М. Шемякина АН СССР.

Энтеротоксигенные штаммы *E. coli* бычьего происхождения были получены из коллекции Института прикладной микробиологии Минмедпрома СССР (г. Оболенск, Московская обл.).

Синтез олигонуклеотидов выполняли твердофазным методом на автоматическом синтезаторе «System 1 plus» (Beckman, США) с использованием Н-фосфонатных сишпонов, активируемых пивалоилхлоридом или адамантоилхлоридом, как описано в работе [13]; олигонуклеотиды очищали электрофорезом в денатурирующем ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Выделение плазмидной и хромосомной ДНК. Плазмидную ДНК выделяли в соответствии с протоколом фирмы Promega Biotech для получения матриц для транскрипции *in vitro*.

Для выделения хромосомной ДНК клетки бактерий выращивали в 250 мл среды LB в течение 16 ч при 37° С. Клетки осаждали центрифугированием (20 мин, 3000 об./мин) и суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ EDTA, после чего замораживали при -70° С. К замороженной суспензии клеток прибавляли 1 мл буфера, содержащего 250 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 10 мг/мл лизоцима, и медленно оттаивали на водяной бане, после чего смесь выдерживали 45 мин при 0° С. Затем прибавляли 2 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 0,5% SDS и 0,4 М EDTA, осторожно перемешивали и выдерживали 60 мин при 50° С. Полученный раствор осторожно в течение 30 мин экстрагировали 12 мл фенола и ДНК осаждали этанолом. Образовавшийся клубок ДНК растворяли в 15 мл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 1 мМ EDTA и 1 мкг/мл РНКазы А, и раствор выдерживали 16 ч при 4° С. После депротенизации смесью фенол - хлороформ (1:1) ДНК осаждали этанолом. Хромосомную ДНК отделяли от раствора наматыванием на стеклянную палочку, промывали 70% этанолом и растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7,5) и 1 мМ EDTA.

Гибридизацию колоний *in situ* и блот-гибридизацию по Саузерну с олигонуклеотидными зондами проводили на нитроцеллюлозных фильтрах BA85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), как описано в работе [14], при 50° С в буфере, содержащем 6×SSC, 0,2% SDS, 2×раствор Денхардта и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из молок лосося.

Нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера, адаптированному к технике PCR [9], с использованием двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы. Компьютерную обработку полученных данных проводили с помощью пакета прикладных программ DNASTAR (версия 89.10).

Рекомбинантные плазмидные ДНК получали как описано в работе [15]. Для конструирования экспрессионной плазмиды рA23ST1 сначала в присутствии 50 пмоль каждого из олигонуклеотидных праймеров (VI) и (VII) проводили амплификацию структурного гена *estA* в 100 мкл буфера, содержащего 10 нг ДНК плазмиды рSPST1, 8,24 мМ (NH₄)₂SO₄, 27,47 мМ трис-НСl, рН 8,8 (при 25° С), 1,65 мМ MgCl₂, 2,75 мМ меркаптоэтанол и 3 ед. ДНК-полимеразы из *T. aquaticus*. Реакцию останавливали экстракцией смесью фенол - хлороформ (1:1), ДНК осаждали этанолом и растворяли в буфере ТЕ. Затем 1 мкг полученного таким образом фрагмента гидролизывали избытком рестриктаз *ClaI* и *HindIII*; полноту прохождения реакции контролировали электрофорезом в 5% ПААГ. Образовавшийся фрагмент после экстракции смесью фенол - хлороформ (1:1), осаждали этанолом, растворяли в буфере ТЕ и использовали в

реакции лигирования с векторными фрагментами, полученными из плазмиды рTNF3314. С этой целью плазмидную ДНК расщепляли рестриктазами *ClaI* и *PstI* и электрофорезом в 1% геле легкоплавкой агарозы выделяли фрагмент величиной около 1 т.п.о.; с другой стороны, ту же ДНК гидролизовали смесью рестриктаз *HindIII* и *PstI*, после чего выделяли фрагмент величиной 3,2 т.п.о. Затем лигировали все три фрагмента и лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* HB101. Скрининг трансформантов проводили гибридизацией ампициллиноустойчивых клонов с олигонуклеотидом (VI). Плазмидную ДНК из гибридирующихся клонов выделяли и ее структуру подтверждали рестриктивным анализом и определением нуклеотидной последовательности части плазмид между сайтами *ClaI* и *PstI* при помощи ДНК полимеразы из *T. aquaticus* с использованием олигонуклеотидов (VI) и (VII) в качестве праймеров.

Иммуноферментный анализ уровня экспрессии клонированного гена термостабильного энтеротоксина проводили с использованием поликлональных кроличьих антител против химически синтезированного пептида. С этой целью плазмидой рA23ST1 трансформировали клетки *E. coli* SG20050 (*lon*⁻) и трансформанты выращивали в течение 8 ч при 37°С в 5 мл среды LB, содержащей ампициллин (50 мгк/мл). Затем 2 мл культуры клеток центрифугировали 5 мин при 4000 об./мин. Супернатант аккуратно отбирали и фильтровали через мембранные фильтры (0,2 мкм, Nalgene, США). Полученный раствор (1–20 мкл) наносили на нитроцеллюлозную мембрану BA85 в разведениях от 1/1 до 1/128 (рис. 3). В качестве положительного контроля использовали синтетический пептид, который наносили в количестве от 10 нг до 30 мкг. Отрицательным контролем служил супернатант не содержащих плазмиды клеток *E. coli* SG20050. Все последующие процедуры проводили при умеренном перемешивании растворов на качалке. Нитроцеллюлозную мембрану помещали в чашку Петри с раствором, содержащим 1% БСА в буфере TBS. Через 1 ч перемешивания при 20°С добавляли поликлональные антитела против ST1, смесь инкубировали 16 ч при 4°С. Отмывку мембраны проводили 0,1% раствором Tween-20 в буфере TBS 5–6 раз по 5 мин при 20°С, после чего мембрану помещали в 1% раствор БСА в буфере TBS и пероксидазный конъюгат козлиных антител против иммуноглобулинов кролика и инкубировали 1,5–2 ч при 20°С. После этого фильтр тщательно отмывали при 20°С сначала 0,1% раствором Tween-20 в буфере TBS, а затем дистиллированной водой. Визуализацию блоттов проводили как описано в работе [16].

Биологическое тестирование термостабильного энтеротоксина проводили на мышах-сосунках, как описано в работе [17]. За единицу биологической активности принимали количество ST, вызывающее накопление жидкости с коэффициентом более чем 0,083 (отношение веса кишечника к весу тела животного); титр энтеротоксина выражался как максимальное разведение супернатанта, содержащее единицу токсической активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Walter S. D. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 9. P. 5490–5493.
2. Stieglitz H., Cervantes L., Robledo R., Fonseca R., Covarrubias L., Bolivar F., Kupersztoch Y. M. // Plasmid. 1988. V. 20. № 1. P. 42–53.
3. Guzman-Verduzco L.-M., Kupersztoch Y. M. // Infect. Immun. 1989. V. 57. № 2. P. 645–648.
4. Ikemura H., Yoshimura S., Aimoto S., Shimonishi Y., Hara S., Takeda T., Takeda Y., Miwatani T. // Bull. Chem. Soc. Jap. 1984. V. 57. № 9. P. 2543–2549.
5. So M., McCarthy B. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 7. P. 4011–4015.

6. Moseley S. L., Hardy J. W., Huq M. I., Esheverria P., Falkow S. // Infect. Immun. 1983. V. 39. № 3. P. 1167-1174.
7. Sekizaki T., Akashi H., Terakado N. // Amer. J. Vet. Res. 1985. V. 46. № 4. P. 909-912.
8. Okamoto K., Takahara M. // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 9. P. 5260-5265.
9. Jausen R., Ledley F. D. // Gene Anal. Techn. 1989. V. 6. № 4. P. 79-83.
10. Gase K., Korobko V. G., Wishniewski H. G., Le J., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Gutsche W., Maksimova Yu. N., Schlott B., Shingarova L. N., Vilcek J., Behnke D. // Immunology. 1990. V. 71. № 3. P. 368-371.
11. Rasheed J. K., Guzman-Verduzco L.-M., Kupersztoch Y. M. // Microbiol. Pathogenesis. 1988. V. 5. № 2. P. 333-343.
12. Dolganov G. M., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247-254.
13. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527-529.
14. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувпило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69-81.
15. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. P. 309-402.
16. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530-1537.
17. Gianella R. A. // Infect. Immun. 1976. V. 14. № 1. P. 95-99.

Поступила в редакцию
7.VIII.1991

A. V. MIKULSKIS, T. I. DOMORADSKAYA, | S. A. FILIPPOV |,
V. N. DOBYRNIN, V. G. KOROBKO

**CLONING AND EXPRESSION OF A GENE CODING FOR THE
ESCHERICHIA COLI THERMOSTABLE ENTEROTOXIN**

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

Gene *estA* coding for thermostable enterotoxin of *Escherichia coli* has been cloned. It is shown that in the *E. coli* strain SA162 this gene is located on the chromosome. Using polymerase chain reaction a site-directed mutagenesis of the cloned gene has been carried out, resulted in a recombinant strain - producer of the thermostable enterotoxin.