

СОЗДАНИЕ СИСТЕМЫ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ И ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА НАРАБОТКИ β -СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА В КЛЕТКАХ *E. coli*

© 2023 Х.Х. Жамгочян, М.В. Замахаяев, Н.Н. Случанко,
А.В. Гончаренко*, М.С. Шумков

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им. А.Н. Баха,
119071 Москва, Россия; электронная почта: pylaevanna@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2023

После доработки 14.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Холера является опасным инфекционным заболеванием, вероятность заражения которым резко возрастает в условиях ограниченного доступа к чистой питьевой воде. Эффективным способом предотвращения холеры является применение вакцин. Одним из их компонентов может служить белок StxB – β -субъединица холерного токсина. В настоящей работе мы создали генетическую систему для наработки рекомбинантного StxB в клетках *Escherichia coli* и выбрали условия для синтеза и очистки целевого продукта на уровне лабораторной культуры. Установлено, что наиболее простым и эффективным способом выделения рекомбинантного белка является выращивание культуры *E. coli* на синтетической среде M9 с глицерином с последующей очисткой StxB из среды культивирования методом металл-хелатной хроматографии. После 48-часовой индукции концентрация целевого продукта в среде может достигать значений 50 мг/литр, при этом белок сохраняет свою пентамерную структуру, что позволяет рассматривать созданную систему как перспективный инструмент промышленного синтеза рекомбинантного StxB в медицинских и исследовательских целях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: β -субъединица холерного токсина, StxB, экспрессия, рекомбинантный белок.

DOI: 10.31857/S0320972523090105, **EDN:** WYVGMK

ВВЕДЕНИЕ

Холера представляет собой острое инфекционное заболевание, основным симптомом которого является диарея. В случае отсутствия лечения болезнь приводит к быстрому обезвоживанию и смерти. Возбудителем холеры является *Vibrio cholerae*, относящийся преимущественно к серотипам O1 и O139 [1]. Заболевание наиболее распространено в странах Африки и Юго-Восточной Азии, однако за последние два столетия (с 1817 г.) также было зафиксировано 7 пандемий [2]. В 2020 г., по сообщениям ВОЗ, холера была отмечена более чем в 80 странах мира с общим числом больных около 323 000 человек [3].

Как правило, инфицирование холерой связано с потреблением заражённой воды или

пищи, поэтому заболевание широко распространено в жарких странах с низким уровнем жизни и ограниченным доступом к чистой питьевой воде [4]. Вместе с тем вероятность его распространения значительно возрастает в условиях стихийных бедствий, локальных конфликтов и гуманитарных кризисов, когда под ударом могут оказаться даже относительно благополучные регионы.

Основные способы профилактики холеры – это обеспечение населения чистой водой и незаражённой пищей, а также вакцинация [5, 6]. На международном уровне известны три холерные вакцины, одобренные ВОЗ. Это Dukoral (Швеция), Shanchol (Индия) и Euvichol (Корея) [7]. Все они являются оральными и созданы на основе цельных убитых клеток холерного вибриона. Однако Dukoral,

Принятые сокращения: ИПТГ – изопропил β -D-тиогалактопиранозид; StxB – β -субъединица холерного токсина; MALDI-TOF – времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией; NB – Nutrient Broth, полноценная питательная среда, аналогичная по составу среде Лурия–Бертани (LB).

* Адресат для корреспонденции.

в отличие от Shanchol и Euvichol, помимо инактивированных нагреванием и формалином клеток *V. cholerae* серотипов O1 и O139, дополнена рекомбинантной β -субъединицей холерного токсина [5]. Такая модификация обеспечивает защиту организма человека не только от холерного вибриона, но и от инфекционных заболеваний, связанных с энтеротоксигенными вариантами кишечной палочки (ЕТЕС). Ревакцинация при использовании вакцины Dukoral рекомендуется через 2 г., при введении Shanchol или Euvichol — через 3 г.

Ранее клинические испытания проходили также вакцины Orochol и Mutachol, созданные на основе живых клеток мутантного холерного вибриона [5]. В медицинскую практику они вошли как препарат Vaxchora (США), однако в декабре 2020 г. производство и продажа этой вакцины были временно прекращены, и в настоящее время она недоступна.

Ещё одна перспективная вакцина создана малайзийскими исследователями [8]. Их прототип лекарственного препарата также содержит живые мутантные клетки возбудителя холеры. В настоящий момент идёт подготовка к клиническим испытаниям.

В России применяется собственная вакцина — холерная бивалентная химическая вакцина [9, 10]. Она представляет собой смесь холерогена-анатоксина и О-антигенов, полученных из инактивированных формалином бульонных культур *V. cholerae* путём выделения, очистки и концентрирования сернокислым аммонием. Приобретённый после вакцинации иммунитет сохраняется в течение полугода [11].

Учитывая возросшие риски биологических угроз для граждан РФ и возможное ограничение доступа к произведённым за рубежом лекарственным препаратам, представляется необходимым модифицировать имеющиеся отечественные вакцины или создать новые, отличающиеся повышенной эффективностью и продолжительностью действия.

Основным фактором патогенеза холеры является выделяемый ею в просвет кишечника холерный токсин, состоящий из α -субъединицы и пяти субъединиц β . Субъединица β (CtxB) формирует устойчивые гомопентамерные структуры с молекулярной массой ~55 кДа [12].

Выведение холерного холотоксина за пределы продуцирующей его клетки в естественных условиях является многостадийным процессом. Белковые молекулы за счёт специфической N-концевой сигнальной последовательности узнаются белком SecA, который обеспечивает их доставку к цитоплазматической мембране и дальнейший транспорт в периплазму за счёт

Sec-комплекса. В периплазме специальная пептидаза производит отщепление от полипептидов их лидерных последовательностей, что позволяет белкам принять нативную конформацию и в итоге соединиться в единую молекулу, включающую субъединицу α и пентамер CtxB. В таком виде собранный холерный токсин захватывается системой секреции второго типа и выводится в окружающую среду за пределы внешней мембраны [13, 14].

Токсичность холерного токсина для эукариотических клеток определяется его α -субъединицей. Пентамер CtxB нетоксичен, но обеспечивает взаимодействие холотоксина с GM1-рецепторами клеток кишечного эпителия человека при инфицировании, что приводит к попаданию токсина в эндоплазматический ретикулум и высвобождению высокотоксичной A1-цепи субъединицы α [15], непосредственно индуцирующей появление клинических симптомов.

Нетоксичность CtxB и его способность запускать развитие выраженного иммунного ответа позволяет широко применять этот белок в качестве адъюванта и основы при разработке вакцин против различных бактериальных и вирусных патогенов [16]. Помимо этого, его используют для подавления патологических иммунных реакций при аллергии и аутоиммунных заболеваниях [16], но в первую очередь вводят в состав противохолерной вакцины в качестве фактора формирования в кишечнике антител, нейтрализующих холотоксин [17].

Потребность в чистом CtxB довольно высока. Он нужен как для профилактики острых кишечных инфекций, так и для иммунологических и биохимических исследований. В связи с этим уже довольно давно предпринимались попытки искусственного получения β -субъединицы холерного токсина в различных организмах: в *V. cholerae* нарабатывали нативный белок [18, 19], в *Lactobacillus* [20], *Bacillus brevis* [21], *Escherichia coli* [22–24], а также растениях [25, 26] — рекомбинантный. В настоящей работе мы решили задачу создания генетической системы и определения условий получения рекомбинантной субъединицы β холерного токсина (CtxB), которая может быть использована либо как дополнение к имеющейся в России холерной вакцине, либо в качестве компонента новой потенциальной вакцины на основе генетически модифицированных нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, дополненных наработанным отдельно белком CtxB.

В качестве продуцента CtxB для решения этой задачи мы выбрали клетки *E. coli*, отличающейся высокой скоростью роста, широким

спектром возможных инструментов для генетической инженерии и хорошо известными особенностями культивирования. Главным аргументом в пользу использования этой бактерии послужило её физиологическое сходство с *V. cholerae*: *E. coli* способна продуцировать аналогичный токсин (термочувствительный токсин *E. coli*), а её система секреции эффективно справляется с выведением в среду токсина холеры [27].

Попытки создания систем экспрессии CtxV в клетках *E. coli* ранее уже предпринимались. Так, в 2010 г. полноразмерный ген *ctxB* (с участком, кодирующим собственную лидерную последовательность) был клонирован в плазмиду pET28a. Экспрессируемый с неё белок нарабатывался в максимальной концентрации 1 мг/литр и, хотя распознавался специфическими антителами, не формировал пентамерных структур, что, по-видимому, было следствием присутствия на его C-конце 6 дополнительных остатков гистидина [22]. В более поздней работе другие авторы клонировали ген *ctxB*, лишённый участка, кодирующего сигнальную последовательность, в вектор pQE30. Максимальный выход белка в этом случае также составлял ~1 мг/литр, однако полученный ими CtxV был способен взаимодействовать с GM1-рецепторами, что свидетельствовало о его нативной конформации. Пентамерная структура рекомбинантного токсина формировалась, даже несмотря на присутствие гексистидинового «хвоста». Однако в этом случае последний располагался на N-конце полипептидной цепи, что, вероятно, и определяло возможность правильной пространственной укладки целевого белка [23]. Наиболее эффективная система получения CtxV в клетках *E. coli* была создана Slos et al. [24]. Они соединили участок гена *ctxB*, кодирующий последовательность зрелой β-субъединицы холерного токсина, с мутагенизированным фрагментом ДНК лидерной последовательности гена *ompA* *E. coli*. Авторы не указали, какого уровня накопления целевого белка им удалось добиться в лабораторных культурах, однако при переходе к выращиванию в полноценной питательной среде в ферментёре (20 литров) выход рекомбинантного CtxV (иммунологически активного пентамера, способного взаимодействовать с GM1-рецепторами) составлял до 1 г/литр.

В настоящей работе мы поставили целью создание системы эффективной экспрессии рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli* путём конструирования химерной молекулы, включающей последовательность зрелого CtxV и сигнальную последо-

вательность белка OmpA внешней мембраны *E. coli* либо PelB *Erwinia carotovora*, а также отработку простого способа получения максимально чистого CtxV на уровне лабораторных культур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и условия культивирования. Использованные в работе штаммы *E. coli* были взяты из коллекции лаборатории. Для осуществления молекулярно-биологических процедур в работе применяли штамм *E. coli* DH5α. С целью наработки целевого белка – штамм *E. coli* BL21(DE3), трансформированный вектором pET22b (+), несущим вставки *ompA*–*ctxB* или *pelB*–*ctxB*. Культуры выращивали при 37 °C и 190 об./мин в среде Nutrient Broth (NB), содержащей (в расчёте на литр) 5 г пептона, 1,5 г мясного экстракта, 1,5 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl («HiMedia», Индия); среде M9, содержащей 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии, или средах модифицированного состава (подробности указаны в соответствующих разделах работы). При культивировании штаммов, трансформированных плазмидами, в среду вносили 100 мкг/мл ампициллина.

Создание экспрессионных плазмид. Конструирование экспрессионных плазмид осуществляли по следующей схеме: (1) амплификация последовательностей ДНК сигнальных пептидов белков OmpA и PelB с использованием в качестве матрицы хромосомы *E. coli* DH5α [28] и плазмиды pET22b (+) («Novagen», США) соответственно; (2) амплификация гена β-субъединицы холерного токсина CtxV с ДНК хромосомы кандидатного вакцинного штамма *V. cholerae* rVCH-31.1 [29]; (3) проведение объединяющей ПЦР для получения *ompA*–*ctxB*- и *pelB*–*ctxB*-конструкций, последовательности праймеров указаны ниже (таблица); (4) гидролиз очищенных ПЦР-продуктов и плазмиды pET22b (+) с помощью эндонуклеаз EcoRI и NdeI («Thermo Scientific», Литва) и последующее лигирование продуктов реакции для получения векторов pET22b *ompA*–*ctxB* и pET22b *pelB*–*ctxB*. Итоговые конструкции были проверены секвенированием.

Экспрессия CtxV. Созданные экспрессионные конструкции вводили в штамм *E. coli* BL21(DE3) методом электропорации. Отобранные на агаризованной (1,5%) среде NB клоны инокулировали в 4 мл жидкой среды NB с ампициллином и выращивали при 37 °C в течение ночи (18 ч). Затем культуры пересевали в питательные среды необходимого состава,

Последовательности праймеров для получения *ompA*–*ctxB*- и *pelB*–*ctxB*-конструкций

Праймер	Последовательность	Сайты рестрикции	Матрица
PelB_Up	atacatATGAAATACCTGCTGCCGACC	NdeI	pET22b (+)
PelB_Low	tcagtaatatTTTgaggtgtGGCCATCGCCGGCT		
OmpA_Up	GGCGCAACATATGAAAAAGACAGCTATC	NdeI	<i>E. coli</i> DH5α
OmpA_Low	TCAGTAATATTTTgaggtgtAGCGGCCTGCGCTAC		
CtxB_Up_Pel	CTGCCCAGCCGGCGATGGCCACACCTCAAAATATTACT	EcoRI	<i>V. cholerae</i>
CtxB_Low_Pel	CCCACTGAATTCGGCTTTTTTATATCTTAATTTG		
CtxB_Up_Omp	CTACCGTAGCGCAGGCCGCTACACCTCAAAATATTACT	EcoRI	<i>V. cholerae</i>
CtxB_Low_Omp	CTGAATTCGGCTTTTTTATATCTTAATTTG		

Примечание. Нуклеотиды, входящие в состав соответствующего сайта рестрикции, выделены полужирным. Строчными буквами обозначены нуклеотиды, вводимые для сайт-направленного мутагенеза в ходе ПЦР.

выращивали при 37 °С до ОП₆₀₀ = 0,8–1,0 и индуцировали наработку целевого белка добавлением в качестве индуктора изопропил β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Сбор образцов производили через 4 или 18 ч после индукции (особенности температурного режима выращивания культуры после внесения индуктора и детали отбора образцов указаны в подписях к рисункам).

Фракционирование клеточной культуры. С целью выявления локализации нарабатываемого белка культуры, экспрессирующие CtxB, разделяли на клеточную (цитоплазматическую), периплазматическую и средовую фракции. Средовой фракцией считали супернатант культуры, отделённый при центрифугировании в центрифуге Eppendorf 5424R («Eppendorf», Германия) в режиме: 20 000 g, 4 °С, 2 мин. Осадок клеток, полученный в этих условиях, ресуспендировали в гиперосмотическом буфере (10 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 1 мМ ЭДТА; 20% сахарозы), выдерживали в течение 10 мин при 4 °С и центрифугировали при 20 000 g, 4 °С в течение 2 мин. Супернатант использовали в качестве периплазматической фракции [14, 24]. Для получения альтернативного варианта периплазматической фракции клетки обрабатывали гиперосмотическим буфером как указано выше, после чего клеточный осадок ресуспендировали в деионизированной воде (4 °С), выдерживали в течение 10 мин и центрифугировали при 20 000 g, 4 °С, 2 мин. По итогам получали

периплазматические фракции, собранные в гипер- (периплазма гиперосм.) и гипоосмотических (периплазма гипоосм.) условиях [30]. Клеточный осадок ресуспендировали в деионизированной воде и считали клеточной (цитоплазматической) фракцией.

ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг. Визуализацию и анализ экспрессируемых белков осуществляли классическим методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле – ДСН-ПААГ [31, 32]. Для подтверждения сохранения пентамерной структуры нарабатываемого белка CtxB электрофорез проводили в неденатурирующих условиях (буфер для нанесения образцов не содержал додецилсульфата натрия (ДСН) и дитиотреитол, подготовка образцов проводилась без этапа тепловой денатурации [18]). Средовые образцы и белки периплазматической фракции перед нанесением на электрофорез концентрировали путём добавления 3 объёмов 95%-ного этанола, преципитации в течение 1–1,5 ч при –20 °С, последующего центрифугирования (20 000 g) в течение 40 мин при 4 °С и разведения небольшим объёмом воды. По завершении электрофореза гели окрашивали в растворе Кумасси, фотографировали, используя GBox («Syngene», США) и обрабатывали с использованием GelAnalyzer 19.1 [33]. Наличие целевого белка в образцах определяли при помощи вестерн-блот-анализа: вначале образцы из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) с размером пор 0,2 мкм методом влажного

переноса в камере Mini Trans-Blot («Bio-Rad»). После проведения переноса мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем растворе, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина («VWR», США) в 157 мМ фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с pH = 7,4. Первичную гибридизацию осуществляли с использованием первичных моноклональных антител к β-субъединице холерного токсина («Хайтест», Россия, каталожный № 2С4) в разведении 1 : 1000 в том же буферном растворе (pH = 7,4) в течение 1 ч. Вторичную гибридизацию проводили с применением конъюгата вторичных поликлональных антител с пероксидазой хрена («Биалекса», Россия, каталожный № L18/02) в разведении 1 : 1000 в том же буферном растворе в течение 1 ч. После каждого этапа мембрану отмывали 157 мМ PBS с добавлением реагента Tween 20 до конечной концентрации 0,1% (v/v). Для визуализации иммунных комплексов осуществляли цветную реакцию в том же буферном растворе с добавлением 4-хлор-1-нафтола («Aldrich», США) в присутствии 0,015% пероксида водорода.

Времяпролётная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (MALDI-TOF). Подтверждение природы нарабатываемого белка осуществляли методом MALDI-TOF-анализа. Для этого из полиакриламидного геля, окрашенного Ку-масси, вырезали фрагмент размером 3–4 мм³ и дважды промывали его в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин. После удаления отмывочного раствора гель дегидратировали добавлением 100 мкл ацетонитрила, который затем сливали. Высушенный на воздухе фрагмент геля обрабатывали раствором модифицированного трипсина (3,5 мкл, 15 мкг/мл, растворитель — 50 мМ NH₄HCO₃). Гидролиз проводили в течение 3 ч при 37 °С. Затем к раствору добавляли 5,25 мкл 0,5%-ной ТФУ в 50%-ном растворе водного ацетонитрила и тщательно перемешивали. Надгелевый раствор использовали в качестве образца для получения MALDI-масс-спектров: на мишени смешивали по 1,5 мкл образца и 0,5 мкл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (10 мг/мл в 20%-ном водном ацетонитриле в присутствии 0,5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролётном масс-спектрометре Ultraflex-treme BRUKER («Bruker Daltonik», Германия), оснащённом УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза

трипсина составляла 0,004% (40 ppm). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z, выбирая оптимальную для достижения наилучшего разрешения мощность лазера.

Обработку масс-спектров осуществляли с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 («Bruker Daltonik»). Идентификация образцов была проведена по локальной базе данных, содержащей аминокислотную последовательность исследуемого белка (с учётом возможных модификаций) при помощи программы Biotools 3.2 («Bruker Daltonik») (опция «пептидный фингерпринт»).

Выделение рекомбинантного CtxB. Металл-хелатная хроматография. Изолированные колонии культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxB* засеивали в 4 мл среды NB с ампициллином и растили на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия) в течение ночи при 37 °С и 190 об./мин. Наутро культуру переносили в 150-мл колбу с 50 мл среды M9, содержащей 2% глицерина (инокуляция 1 : 100), и культивировали в тех же условиях. Через сутки культуру разводили в среде M9 с глицерином или 2-кратной среде NB (2NB) до ОП₆₀₀ = 0,3, переносили в колбу на 750 мл (250 мл культуры), выращивали при тех же условиях до ОП₆₀₀ = 0,8–1,0 и индуцировали экспрессию рекомбинантного CtxB добавлением ИПТГ. Индуцированную культуру оставляли на ночь (18 ч) при температуре 20 или 25 °С и 190 об./мин. Далее супернатант отделяли центрифугированием (3150 g, 4 °С, 20 мин, затем повторно — 20 000 g, 4 °С, 20 мин) и использовали для выделения CtxB методом аффинной хроматографии [34]. Для этого через колонку с иммобилизованной на сефарозе иминодиуксусной кислотой («Sigma», США; I4510), активированной 0,1 М NiSO₄, предварительно уравновешенную буфером А (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, pH = 8,0) пропускали бесклеточный супернатант (осветлённую культуральную жидкость без дополнительных модификаций). Затем колонку промывали буфером А от несвязавшихся с носителем белков. Смыв с колонки целевого рекомбинантного белка осуществляли буфером В (20 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl, 150 мМ имидазола, pH = 8,0), установив градиент 0–100%. Собранные фракции диализовали (состав буфера: 2,7 мМ KCl, 1,5 мМ KH₂PO₄, 136,9 мМ NaCl, 8,09 мМ Na₂HPO₄·7H₂O, pH = 7,1) и анализировали электрофоретически.

Анализ олигомерного состояния рекомбинантного CtxB методом гель-фильтрации с многоугловой детекцией статического светорассеяния (SEC-MALS). Раствор электрофоретически чистого препарата CtxB центрифуги-

ровали (20 000 g) в течение 5 мин при 4 °С, и полученный супернатант использовали для анализа, внося аликвоту через инжектор хроматографической системы Prostar («Varian», Австралия), состоящей из насосов высокого давления Prostar 210, диодноматричного детектора (Prostar 335, 190–950 нм) и детектора miniDAWN («Wyatt technology», США), регистрирующего статическое светорассеяние при трёх фиксированных углах 45, 90 и 135 градусов. В качестве колонки использовали Superdex 200 Increase 10/300 («GE Healthcare», США), которую предварительно уравнивали несколькими объёмами дегазированного и отфильтрованного через 0,1 мкм фильтры Millipore («Millipore», США) буфера для гель-фильтрации (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH = 7,6), в котором также проводили анализ исследуемых образцов. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. В первую очередь получали профиль элюции и проводили анализ массы бычьего сывороточного альбумина (БСА, объём нанесения 100 мкл с концентрацией 1,8 мг/мл), представленного смесью мономеров (66,5 кДа), димеров (133 кДа), тримеров (199 кДа) и небольшой фракции тетрамеров (265 кДа) для проверки правильности обработки данных. Затем наносили аликвоту CtxB (100 мкл с концентрацией 1,75 мг в мл). Для проверки стабильности олигомерного состояния CtxB получали профиль элюции, нанося впятеро меньшее количество белка на колонку. Полученные для каждой точки профиля элюции данные о концентрации белка, измеряемые с помощью диодноматричного детектора (поглощение при 280 нм, коэффициент экстинкции равен $0,667 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для БСА и $0,86 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ — для зрелой формы CtxB), а также значения интенсивности статического лазерного (660 нм) светорассеяния при трёх фиксированных углах использовали для расчёта молярной массы. Расчёты проводили в программном пакете Astra 8.0 («Wyatt technology»), принимая dn/dc равным 0,185 и используя указанные выше коэффициенты экстинкции. Детектор светорассеяния был предварительно откалиброван по рассеянию толуола.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически при помощи NanoPhotometer NP80 («Implen», Германия) в режиме УФ-поглощения при 280 нм. Расчётный коэффициент поглощения для CtxB составил 0,86, коэффициент молярной экстинкции — $9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Статистический анализ. Все эксперименты по индукции CtxB проведены не менее, чем

двукратно. Определение достоверности различий между выборками проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Статистический анализ осуществляли в пакете программного обеспечения Statistica 7.0 («StatSoft»).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание системы экспрессии β -субъединицы холерного токсина в клетках *E. coli*. β -Субъединица холерного токсина является секретруемым белком и в естественных условиях выходит из клеток *V. cholerae* в просвет кишечника [15]. Для этого в аминокислотной последовательности CtxB присутствует N-концевая сигнальная последовательность, обеспечивающая транспорт белка через цитоплазматическую мембрану в периплазму [35], где холерный токсин захватывается системой секреции второго типа и выводится в окружающую среду [13]. Поскольку система секреции второго типа *E. coli* способна эффективно транспортировать CtxB [27], создание системы гетерологичной экспрессии субъединицы β холерного токсина в клетках этого микроорганизма подразумевает необходимость оптимизации экспорта нарабатываемого белка в первую очередь за счёт подбора сигнальной последовательности. Ранее осуществлялись попытки экспрессии CtxB в клетках *E. coli* с собственной лидерной последовательностью [22, 23], но созданные генетические системы отличались довольно низким выходом целевого продукта ($\sim 1 \text{ мг/л}$). В настоящей работе в качестве сигналов экспорта β -субъединицы холерного токсина за пределы цитоплазмы мы выбрали лидерную последовательность гена «родного» для *E. coli* белка наружной мембраны *ompA* [36] и используемую в коммерческих системах (вектор pET22b(+); «Novagen», США) сигнальную последовательность пектатлиазы В (*pelB*) *E. carotovora* [37, 38] — оба эти пептида довольно давно известны в качестве инструмента транспорта синтезируемого белка через внутреннюю мембрану в периплазматическое пространство [39–41]. Предлагаемая нами система экспрессии β -субъединицы холерного токсина была создана путём конструирования химерных ДНК, содержащих ген *ctxB* *V. cholerae* [42], слитый с последовательностями, кодирующими лидерные пептиды OmpA и PelB (рис. 1). Итоговые конструкции в составе вектора pET22b(+) ввели в клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3).

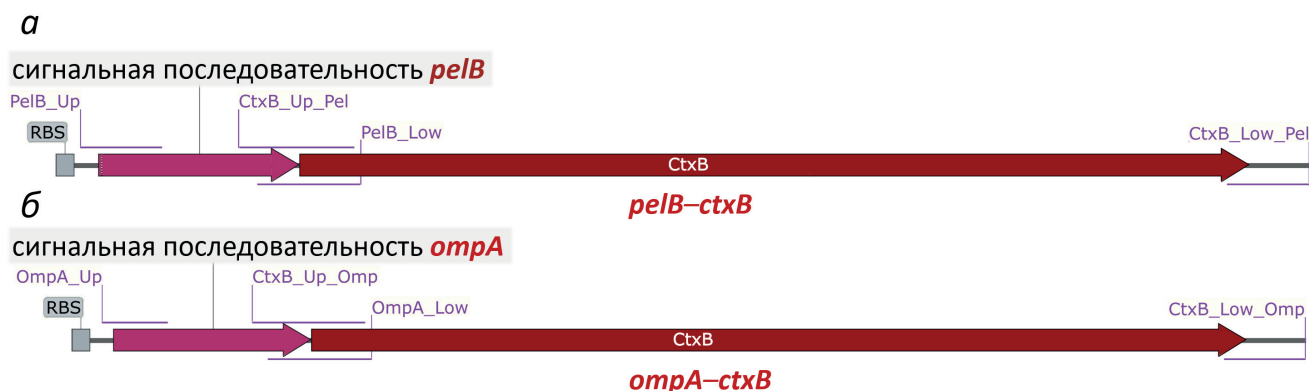


Рис. 1. Схемы генетических конструкций *pelB-ctxB* (а) и *ompA-ctxB* (б), интегрированных в экспрессионный вектор рЕТ22b (+). Указаны последовательности, кодирующие лидерные пептиды OmpA и PelB, последовательности, кодирующие зрелый белок CtxB, места расположения использованных праймеров и сайты связывания рибосом (RBS)

Полные карты созданных плазмид, аминокислотные последовательности транслируемых с векторов химерных полипептидов и аминокислотная последовательность белка CtxB без лидерного участка (каким он должен быть в составе пентамера) представлены на рис. П1–П5 в Приложении.

Определение температурного и временного режимов экспрессии *ctxB*. На следующем этапе выбрали по 2 варианта клонов трансформантов *E. coli* BL21(DE3) с каждой из генетических конструкций (*ompA-ctxB* и *pelB-ctxB*). Оценка работоспособности созданных плазмид показала, что рекомбинантный CtxB синтезируется во всех проверенных клонах (рис. 2, а). При этом максимальное накопление целевого белка в клетках *E. coli* наблюдалось в условиях «холодовой» индукции в течение ночи (20 °С, 18 ч) и было наиболее высоким в варианте *E. coli* BL21(DE3) рЕТ22b *ompA-ctxB* A1 (рис. 2, б).

Таким образом, нам удалось создать генетические конструкции, пригодные для наработки CtxB в клетках *E. coli*, и определить режим культивирования, обеспечивающий наиболее эффективный синтез целевого белка.

Выявление локализации нарабатываемого CtxB. Поскольку экспрессируемый CtxB должен выбрасываться клеткой за её пределы [14], на следующем этапе работы был поставлен вопрос о локализации нарабатываемого белка: накапливается ли он в цитоплазме, остаётся в периплазматическом пространстве или выходит в среду.

Отделение культуральной жидкости и последующее фракционирование клеток показали, что в анализируемых условиях в среду экспортируется относительно небольшое количество синтезируемого CtxB (3–6%), его основная часть остаётся в клеточной фракции (92–94%). При этом в периплазматическом

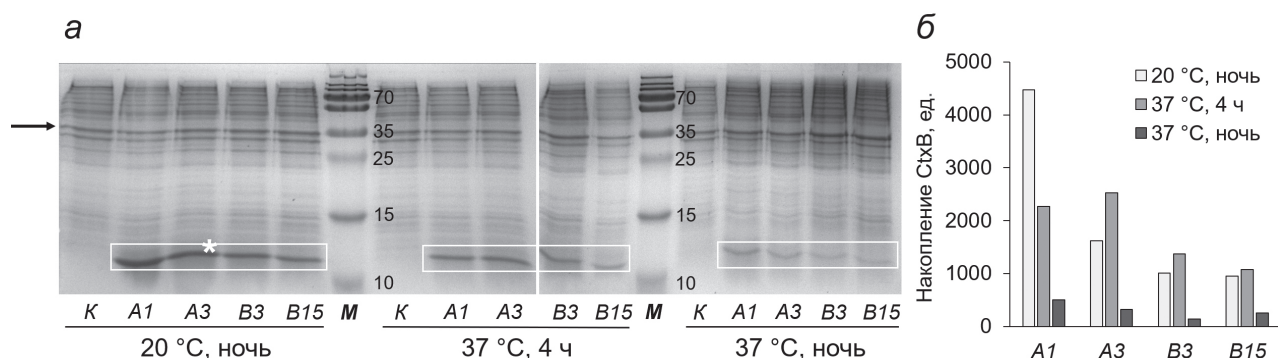


Рис. 2. Определение температурного и временного режимов экспрессии *ctxB*. **а** – Денатурирующий электрофорез лизатов клеток, экспрессирующих CtxB. 15%-ный ДСН-ПААГ. Культуры *E. coli* BL21(DE3) рЕТ22b *ompA-ctxB* (варианты A1 и A3) и BL21(DE3) рЕТ22b *pelB-ctxB* (варианты B3 и B15) выращивали при 37 °С и 190 об./мин в пробирках на 15 мл, содержащих 4 мл среды NB с добавлением ампициллина. На гель нанесено 8 мкл бактериальной культуры, доведённой до ОП₆₀₀ = 1,0. *K* – контрольная культура *E. coli* BL21(DE3); *M* – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder («Thermo Fisher Scientific», США), цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником. * – фрагмент геля, взятый для MALDI-TOF-анализа. **б** – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый на основе пересчёта интенсивности полос целевого белка на интенсивность полос референсного белка, в качестве которого взят белок *E. coli* массой 35 кДа (обозначен стрелкой). Светлые столбцы – индукция в течение 18 ч при 20 °С, серые столбцы – индукция 4 ч, 37 °С, тёмно-серые – 18 ч, 37 °С

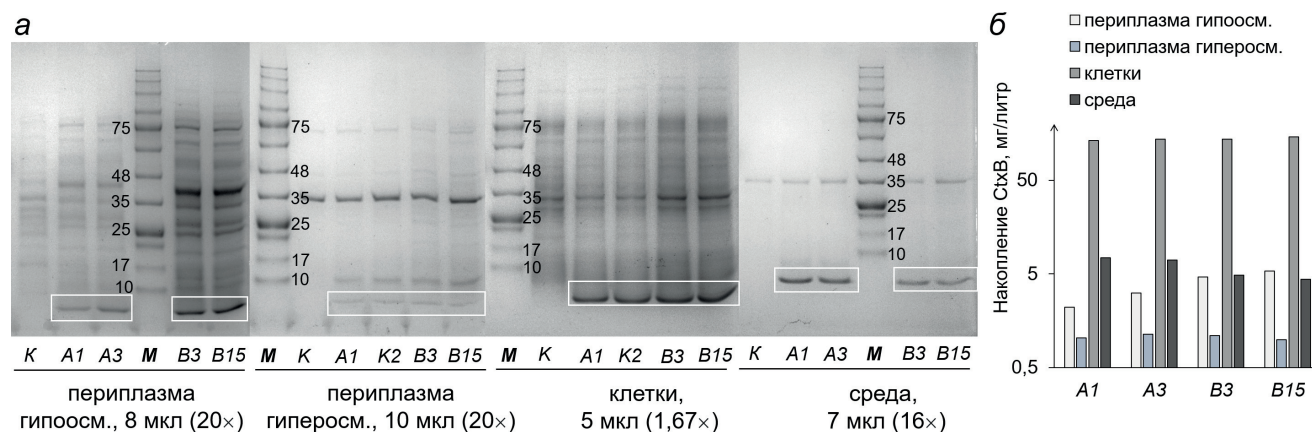


Рис. 3. Выявление локализации нарабатываемого CtxB. *a* – Электрофорез фракций культур *E. coli*, экспрессирующих CtxB. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%), неденатурирующие условия. Культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxB* (варианты A1 и A3) и BL21(DE3) pET22b *pelB*–*ctxB* (варианты B3 и B15) выращивали при 37 °C и 190 об./мин в колбах на 150 мл, содержащих 50 мл среды NB с добавлением ампициллина, после внесения ИПТГ выдерживали при 20 °C, 190 об./мин, 18 ч. Количество нанесённого на гель образца и степень его концентрирования указаны под электрофореграммой. *K* – контрольная культура *E. coli* BL21(DE3); *M* – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder, цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником. *б* – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый путём пересчёта интенсивности полос целевого белка по калибровочной кривой, построенной на основе интенсивности полос известных концентраций БСА, нанесённых на тот же гель, с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке и объёма нанесённого на гель образца. Представлены данные по периплазматической фракции, полученной при обработке клеточного осадка гипоосмотическим раствором после гиперосмотического, периплазматической фракции, полученной при обработке клеточного осадка гиперосмотическим раствором, лизату клеток штамма-продуцента и средовой фракции

пространстве в зависимости от способа фракционирования обнаруживается 0,6–4% целевого белка (рис. 3). Следует заметить, что известно несколько способов выделения периплазматической фракции клеток *E. coli*. Наиболее простые из них – обработка клеточного осадка гиперосмотическим раствором или комбинацией гипер- и гипоосмотического растворов [30]. Применив каждый из них, мы выявили, что в первом случае выход белка существенно ниже (менее 1% от общего содержания CtxB в клетке в сравнении с 2,2–4% при комбинации гипер- и гипоосмотических стрессов). В то же время именно гиперосмотический шок позволяет получить фракцию периплазматических белков с минимальной примесью клеточных полипептидов (рис. 3). Эти результаты практически совпали с полученными ранее данными других авторов [30] и послужили основанием к использованию только гиперосмотической обработки с целью получения периплазматической фракции в последующих экспериментах.

Таким образом, анализ локализации нарабатываемого CtxB позволяет заключить, что созданная система экспрессии даёт возможность очищать β -субъединицу холерного токсина как из лизата клеток, так и из супернатанта культуры-продуцента.

Анализируя штаммы-продуценты, экспрессирующие CtxB с разными лидерными последовательностями, мы также попытались

установить, есть ли связь между уровнем продукции целевого белка и введённым сигналом секреции. Относительную эффективность лидерных пептидов проверяли на основе цифровых данных, отражённых на рис. 2 и 3. Сравнение уровня накопления CtxB в разных условиях индукции (рис. 2) и в различных фракциях бактериальной культуры (рис. 3) было проведено с использованием U-критерия Манна–Уитни при уровне значимости $p \leq 0,05$. Несмотря на заметную на графиках тенденцию к более высокому уровню накопления целевого белка в штаммах, несущих конструкцию *ompA*–*ctxB*, статистически значимых различий обнаружено не было. Таким образом, нам не удалось показать преимущество лидерных последовательностей *ompA* либо *pelB* для наработки в клетках *E. coli* рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина (вероятно, это связано с ограниченным объёмом выборки), однако обнаруженная тенденция послужила основанием для использования в дальнейших экспериментах штамма BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxB* A1.

Выбор оптимальной среды для экспрессии CtxB и оценка его способности образовывать олигомерные структуры. Эффективность синтеза рекомбинантного белка, его выхода из клетки и последующей очистки может в значительной степени определяться составом среды культивирования. Это связано и с различной скоростью роста штамма-продуцента,

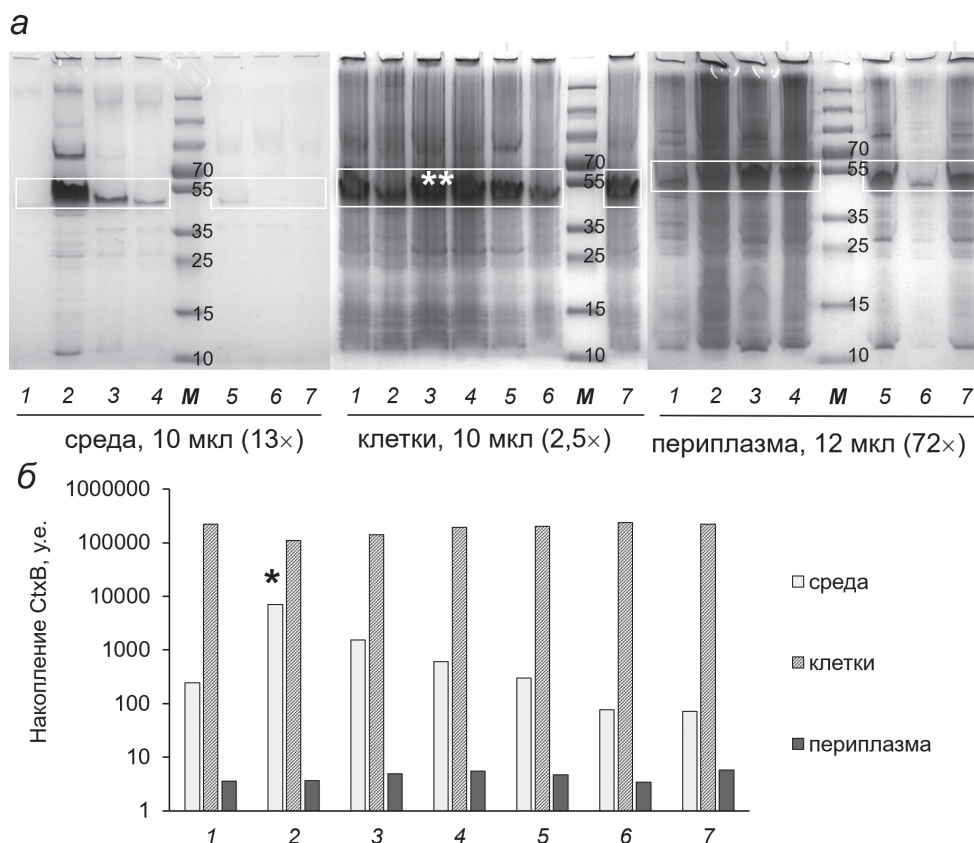


Рис. 4. Определение наилучшей среды культивирования для экспрессии и очистки CtxB. *а* – Электрофорез фракционированных культур *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA–ctxB* A1, выращенных на разных средах. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%), неденатурирующие условия. Клетки культивировали при 37 °С и 190 об./мин в колбах на 250 мл, содержащих 50 мл среды с добавлением ампициллина. После внесения ИПТГ культуры выдерживали при 20 °С и 190 об./мин 18 ч. 1 – среда NB; 2 – среда 2NB; 3 – 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии; 4 – 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина и 0,05% глюкозы; 5 – M9, содержащая 2% глицерина; 6 – M9, содержащая 0,1% глюкозы; 7 – M9, содержащая 2% глицерина и 0,1% глюкозы; M – маркер молекулярных масс белков PageRuler Plus Prestained protein ladder. Область расположения белка CtxB выделена белым прямоугольником. ** – фрагмент геля, взятый для MALDI-TOF-анализа. *б* – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый на основе интенсивности полос целевого белка с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке, объёма нанесённых на гель образцов и пересчётом на плотность культуры. Светло-серые столбцы – средовая фракция, серые – лизат клеток штамма-продуцента, тёмно-серые – периплазматическая фракция, полученная при обработке клеточного осадка гиперосмотическим раствором. Количество нанесённого на гель образца и степень его концентрирования указаны под электрофореграммой, кроме * – концентрирование в 9,5 раз

и с особенностями его метаболизма, и с присутствием в среде, помимо целевого белка, иных полипептидных молекул, которые могут мешать его связыванию с носителем на колонке. Помимо этого, состав среды определяет её стоимость, что является значимым фактором при переходе от лабораторной наработки рекомбинантного белка к его промышленному производству. Исходя из этого, перед нами встала задача определения наилучшей для экспрессии и очистки целевого белка среды культивирования.

Для анализа были подготовлены 7 сред: (1) NB; (2) 2NB (2-кратная NB); (3) 1/2NB + 1/2M9 (среда с половинной концентрацией компонентов NB и половинной концентрацией компонентов M9), содержащая 2% глицерина в качестве источника углерода и энергии; (4) 1/2NB + 1/2M9, содержащая 2% глицерина

и 0,05% глюкозы; (5) M9, содержащая 2% глицерина; (6) M9, содержащая 0,1% глюкозы; (7) M9, содержащая 2% глицерина и 0,1% глюкозы. Из четырёх использованных ранее штаммов-продуцентов выбрали один – BL21(DE3) pET22b *ompA–ctxB* A1 (рис. 4).

При анализе фракций бактериальной культуры в условиях неденатурирующего электрофореза было хорошо заметно (рис. 3), что белок успешно формировал комплексные структуры с электрофоретической подвижностью, соответствующей кажущейся массе ~50 кДа, что примерно совпадало с подвижностью пентамера белка (расчётная масса – 58 кДа). Проведённый затем MALDI-TOF-анализ показал соответствие аминокислотной последовательности анализируемого белка β-субъединице холерного токсина. При этом накопление

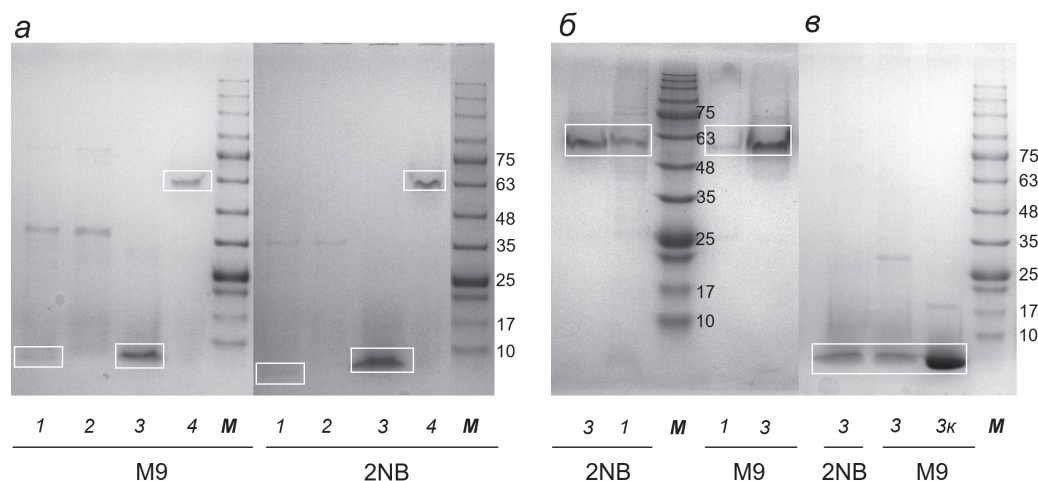


Рис. 5. Электрофорез рекомбинантного CtxB в процессе очистки и после диализа. Градиентный ДСН-ПААГ (8–18%). Показаны последовательные фракции нанесения и элюции образцов на металл-хелатную колонку (а), неденатурирующий (б) и денатурирующий (в) электрофорез супернатанта культур-продуцентов и очищенного белка CtxB. М – Маркер молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB, цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). 1 – Супернатант культур-продуцентов, который наносили на колонку, 2 – фракция белков, не связавшихся с колонкой, 3 – выделенный CtxB после проведения диализа, 4 – образец 3 в неденатурирующих условиях, 3к – концентрированный образец 3. Количество CtxB, нанесённого на дорожки панели в составило 0,33 мкг (2NB); 0,48 мкг (M9); 2,8 мкг (M9, дорожка 3к). Область расположения CtxB выделена белым прямоугольником

рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина в клеточном лизате штамма-продуцента мало отличалось в различных питательных средах. Максимальное содержание CtxB в супернатанте культуры наблюдалось в наиболее «богатой» среде 2NB. В силу присутствия значительного разнообразия пептидных компонентов выделение CtxB из такой среды может требовать дополнительных ступеней очистки. При этом мы ставили перед собой задачу сделать процесс выделения целевого белка максимально простым и эффективным, а при переходе к промышленным объёмам его наработки – ещё и сопровождающимся минимальными затратами. Исходя из этого, на следующем этапе работы мы оценили выход рекомбинантного CtxB при его очистке из супернатанта культур-продуцентов, выращенных как на богатой, так и на минимальной питательных средах.

Выделение рекомбинантного CtxB. Для очистки белка CtxB были выращены две различные культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA-cxv* A1 – на богатой питательной среде 2NB и минимальной среде M9 с глицерином. Поскольку β -субъединица холерного токсина способна эффективно адсорбироваться на колонке, активированной ионами никеля [43], очистку целевого белка проводили методом металл-хелатной хроматографии. Супернатант культуры (осветлённую среду без дополнительных модификаций) наносили на колонку, содержащую 2 мл носителя, порциями объёмом до 150 мл. Скорость потока при нанесении составляла 3 мл/мин, при смыве CtxB с ко-

лонки – 1 мл/мин. Хроматограммы нанесения и элюции супернатантов культур, выращенных на 2NB и M9, приведены на рис. П6 и П7 в Приложении.

К сожалению, по результатам серии из 4 экспериментов нам не удалось установить, какую среду предпочтительнее использовать для наработки рекомбинантного CtxB. В неденатурирующих условиях β -субъединица холерного токсина в случае обеих сред движется в геле как белок массой ~60 кДа, что соответствует расчётной массе пентамера CtxB (рис. 5, а и б). Чистота этого белка, если оценивать её на основе электрофореза (рис. 5, б), составляет ~96% для CtxB, выделенного из супернатанта культуры, выращенной на среде M9, и ~80% – в случае супернатанта культуры, выращенной на 2NB. В то же время общее накопление белка (по результатам обсчётов рис. 5, а, выполненных с использованием калибровочной кривой, построенной по яркости полос известных концентраций БСА, нанесённых на тот же гель) выше в супернатанте бульонной культуры (43 мг/литр в сравнении с 28 мг/литр в супернатанте культуры, выращенной на среде M9). Эффективность очистки CtxB из супернатанта (доля целевого белка в диализованном растворе относительно исходного количества белка в осветлённом супернатанте) не зависела от состава среды и изменялась в пределах 28–35%. Таким образом, исходя из итогового выхода белка, лучше выращивать штамм-продуцент на среде 2NB, однако с целью получения максимально чистого

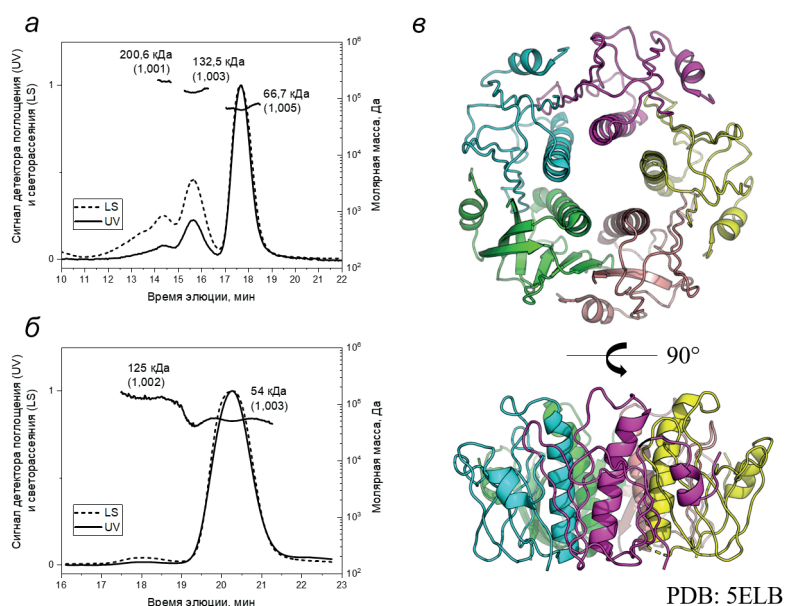


Рис. 6. Анализ олигомерного состояния рекомбинантного белка CtxB методом SEC-MALS. *a* – Профиль элюции БСА, детектированный по поглощению на 280 нм (UV) и светорассеянию при 90° (LS). Показано распределение молярной массы для трёх основных пиков БСА – мономеров, димеров и тримеров, с указанием средней массы по каждому из пиков и их показателем полидисперсности (указанное в скобках соотношение Mw/Mn). Абсолютно мономодисперсный образец имеет Mw/Mn, равное 1. *б* – Профиль элюции CtxB, зарегистрированный аналогично БСА. Показано распределение молярной массы, захватывающее основной пик и предшествующий ему минорный пик, средние значения массы по каждому из пиков даны в кДа, также приведено значение индекса полидисперсности для каждого из пиков. *в* – Кристаллическая структура пентамера CtxB, показанная с двух ортогональных ракурсов. Субъединицы визуализированы разными цветами в виде ленточной диаграммы

препарата за одну стадию очистки следует на-
рабатывать CtxB в среде M9.

**Анализ олигомерного состояния рекомби-
нантного CtxB.** Для оценки чистоты и олиго-
мерного состояния выделенного CtxB мы взяли
образец препарата, полученного путём выделе-
ния из супернатанта культуры, выращенной на
среде M9. После диализа и концентрирования
путём переосаждения в присутствии этанола
раствор CtxB был проанализирован методом
SEC-MALS, который является одним из наи-
более точных способов определения абсолют-
ной молекулярной массы растворимых белков
даже в присутствии примесей [44–46]. Так, с
помощью данного метода мы разделили оли-
гомерные формы БСА и смогли определить
их молярную массу с ошибкой менее чем 1%
(например, расчётная масса мономера БСА со-
ставляет 66,5 кДа, экспериментально получен-
ное значение – 66,7 кДа) (рис. 6, *a*). Профиль
элюции белка CtxB был представлен основным
пиком, в котором находилось ~97% материала,
а также минорным пиком (2,7%) (рис. 6, *б*).
Средняя абсолютная молярная масса в основ-
ном пике составила 54 кДа, что достаточно
близко к расчётному значению для пентамера
CtxB (58 кДа) (модель его структуры приве-
дена на рис. 6, *в*). Минорный пик, возможно,
соответствует декамеру CtxB, однако точность

определения массы (125 кДа, против 116 кДа
расчётной массы) не позволяет утверждать это
однозначно. Тем не менее любопытно отме-
тить, что в независимой части кристаллической
структуры CtxB (PDB: 5ELB) присутствует
именно димер из пентамеров (декамер). Про-
ведённый анализ указывает на то, что реком-
бинантный CtxB является преимущественно
пентамером (и выделяется в таком виде) и со-
держит незначительное количество примесей
(не более 3%).

**Динамика накопления целевого продукта в
периодической культуре.** Поскольку скорость
роста культуры *E. coli* в полноценной и синте-
тической среде существенно различаются, мы
предположили, что 18 ч культивирования может
быть недостаточно для реализации потенциа-
ла накопления CtxB в среде M9 с глицерином.
В связи с этим была проведена оценка динами-
ки наработки рекомбинантного CtxB в перио-
дической культуре *E. coli* BL21(DE3) pET22b
ompA–ctxB A1 при выращивании её на синте-
тической питательной среде M9 в течение про-
должительного времени. Анализ накопления
CtxB в среде культивирования показал, что
синтез целевого белка и его транспорт за пре-
делы клетки не останавливаются при дости-
жении культурой стационарной фазы и про-
должаются не менее чем в течение 2 суток

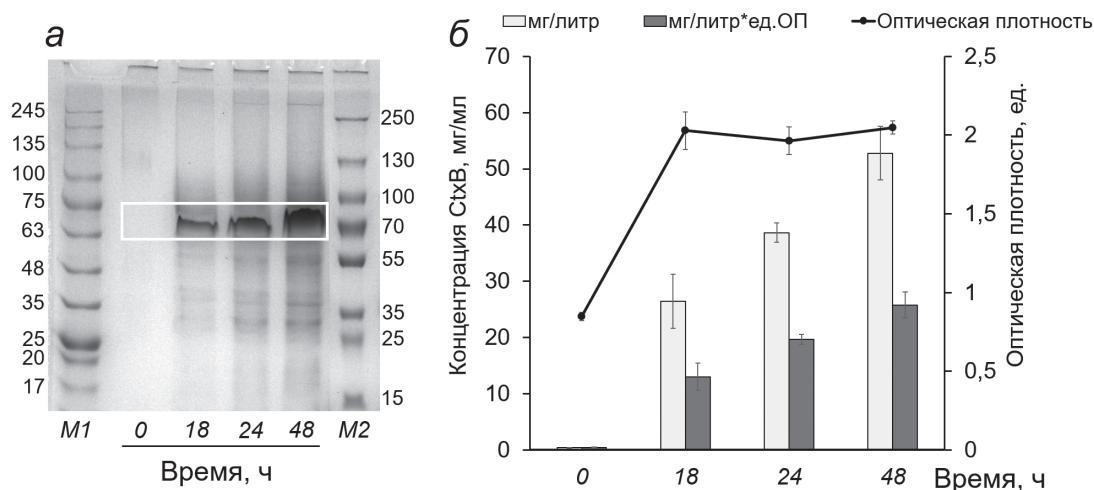


Рис. 7. Динамика накопления CtxB в периодической культуре. *a* – Электрофорез средовой фракции культуры *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxB* A1, выращенной на среде M9 с глицерином. После добавления индуктора клетки культивировали при 25 °C и 190 об./мин в колбах на 250 мл, содержащих 50 мл среды с добавлением ампицилина. Электрофорез проводили в градиенте ДСН-ПААГ (8–18%) в неденатурирующих условиях. Представлены образцы, взятые через разное время после добавки ИПТГ. *M1* и *M2* – Маркеры молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB и PageRuler Plus Prestained protein ladder («Thermo Fisher Scientific») соответственно. Цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения белка CtxB выделена белым прямоугольником. *б* – Количественный анализ содержания CtxB в геле, проведённый на основе оценки интенсивности полос целевого белка с учётом концентрирования образцов при пробоподготовке и сравнения с полосой белка известной концентрации. Светлые столбцы – концентрация CtxB в супернатанте, рассчитанная на 1 литр культуры (мг/литр), тёмные – концентрация CtxB, скорректированная с учётом оптической плотности (мг/литр × ед. ОП). Кривая отражает оптическую плотность (ОП) культуры в момент отбора образцов (ассоциирована с правой осью ординат). Данные представлены в формате среднее ± среднее квадратичное отклонение

с момента индукции (рис. 7, *a*). Продукция CtxB при этом достигает значений более 50 мг/литр среды (рис. 7, *б*).

Таким образом, увеличение времени индукции и, вероятно, использование для выращивания культур-продуцентов аппаратов непрерывного культивирования должно позволить получить больший выход целевого белка на единицу объёма культуры.

Подтверждение природы рекомбинантного белка. Белок, нарабатываемый в созданной нами системе экспрессии, был идентифицирован методом MALDI-TOF. Анализ фрагментов гелей по результатам денатурирующего (рис. 2) и неденатурирующего (рис. 4) электрофорезов подтвердил, что полосы с молекулярной массой ~10 и ~60 кДа соответственно действительно содержат зрелый белок CtxB *V. cholerae*. Вестерн-блоттинг очищенного на колонке CtxB показал, что белок эффективно взаимодействует со специфичными моноклональными антителами (рис. 8), что подтверждает его антигенное соответствие β-субъединице холерного токсина дикого типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы создали генетическую систему, позволяющую синтезировать

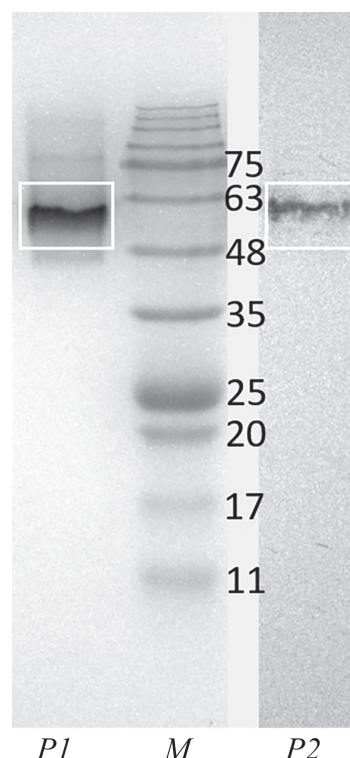


Рис. 8. Электрофорез (*P1*) и вестерн-блоттинг (*P2*) очищенного CtxB. 15%-ный ДСН-ПААГ, неденатурирующие условия. *M* – Маркер молекулярных масс белков Prestained Protein Ladder, HiGenoMB. Цифрами обозначены значения молекулярных масс (кДа). Область расположения белка CtxB выделена белым прямоугольником

препаративные количества рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина (до 50 мг/литр) в клетках *E. coli*. Она характеризуется введением в экспрессионный вектор фрагмента гена, кодирующего зрелый белок CtxB, слитого с последовательностью, кодирующей лидерный пептид гена *ompA* *E. coli* (рис. 1, а) или гена *pelB* *E. carotovora* (рис. 1, б). Экспрессия полученного составного гена приводит к синтезу химерной полипептидной цепи, транспортируемой за пределы клетки.

Экспериментально установлено, что выход целевого белка повышается при культивировании клеток *E. coli* в условиях сниженной температуры – 20–25 °С (рис. 2 и 7). Наибольшее накопление рекомбинантного CtxB отмечено в лизате клеток, выращенных на богатой питательной среде (рис. 3 и 4). Максимальное содержание CtxB в супернатанте культур-продуцентов наблюдалось также в среде 2NB.

Нам не удалось продемонстрировать статистически значимых различий в уровне накопления CtxB при использовании лидерных последовательностей генов *ompA* и *pelB*, однако тенденция к большему выходу β-субъединицы холерного токсина в штаммах с конструкцией *ompA*–*ctxB* (рис. 2 и 3) послужила основанием для использования в экспериментах по выделению целевого белка и определению динамики его накопления в среде культивирования штамма *E. coli* BL21(DE3) pET22b *ompA*–*ctxB* A1.

Выделение белка CtxB методом металл-хелатной хроматографии показало, что выход целевого продукта больше в случае бактериальной культуры, выращенной на полноценной питательной среде 2NB (~15 мг/литр), в то же время его чистота значительно выше (96%) при использовании супернатанта культуры, выращенной на синтетической среде М9 (рис. 5 и 6). Мы предполагаем, что это обусловлено присутствием в богатых питательных средах компонентов пептидной природы, которые могут выделяться на колонке вместе с CtxB. Очевидно, это означает необходимость использования дополнительных этапов очистки целевого белка при его получении из супернатанта культур, выращенных на богатых питательных средах. Вместе с тем при выращивании бактерии-продуцента на синтетической среде получение чистого целевого белка возможно в одну стадию.

При продолжительном росте на среде М9 содержание целевого белка в среде культивирования постоянно возрастает и через 48 ч после индукции достигает 50 мг/литр (рис. 7). При этом белок отличается стабильностью и

сохраняет свою естественную пентамерную структуру (рис. 4–7).

Следует заметить, что нам удалось достигнуть довольно высоких значений выхода рекомбинантного CtxB при его наработке в клетках *E. coli*. Единственная из более ранних работ, в которой выход целевого продукта был больше (1 г/литр), реализована с использованием биореактора для выращивания культуры [24]. Соответственно, достигалась существенно более высокая плотность биомассы (18 г/литр) и, как следствие, большая наработка β-субъединицы холерного токсина. В своей работе авторы экспрессировали CtxB с лидерной последовательностью белка *OmpA*, однако, в отличие от нашей системы экспрессии, использованный ими сигнальный пептид нёс ряд аминокислотных замен. Кроме того, для очистки целевого белка они использовали катионообменную хроматографию.

Системы получения рекомбинантной β-субъединицы холерного токсина, созданные ранее в России, отличались значительно более низким уровнем накопления CtxB в среде культивирования. Штамм KS3043 давал выход целевого белка 0,85 мг/литр [47], штамм KM174 – 10 мг/литр [48]. В обоих случаях авторы вводили в экспрессионную конструкцию ген β-субъединицы холерного токсина без дополнительных модификаций (замена участка лидерной последовательности или промотора). По-видимому, именно это стало причиной относительно невысокой продукции рекомбинантного CtxB [24]. Кроме того, в случае штамма KS3043 низкий выход белка, очевидно, был связан с накоплением β-субъединицы холерного токсина в периплазме без её секреции в среду культивирования [24]. В штамме *E. coli* KM147 продуцируемый CtxB транспортировался за пределы клетки, однако использование интегративного вектора ограничивало копийность введённого гена, тем самым снижая уровень накопления β-субъединицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами создана генетическая система и разработан способ наработки рекомбинантного CtxB, в соответствии с которым оптимальным для одностадийного выделения высокоочищенной β-субъединицы холерного токсина представляется выращивание культуры штамма-продуцента на синтетической питательной среде М9 с последующей очисткой белка из культуральной жидкости методом металл-хелатной хроматографии.

Для получения большего выхода CtxV с единицы объема культуры предпочтительны выращивание культуры-продуцента в полноценной питательной среде и очистка целевого белка в несколько стадий. Максимальный полученный нами уровень накопления рекомбинантной β -субъединицы холерного токсина в среде культивирования на уровне лабораторной культуры составил 50 мг/литр (с выходом очищенного белка 15 мг/литр). При переходе к выращиванию культуры-продуцента в аппаратах непрерывного культивирования выход рекомбинантного CtxV наверняка удастся многократно повысить, однако оптимизация методов наработки и очистки белка на этом уровне потребует дополнительных исследований.

Вклад авторов. М.С. Шумков, А.В. Гончаренко — концепция и руководство работой; Х.Х. Жамгочян, М.С. Шумков, М.В. Замахаев,

Н.Н. Случанко — проведение экспериментов; М.С. Шумков, А.В. Гончаренко — обсуждение результатов исследования; М.С. Шумков, М.В. Замахаев — написание текста; М.В. Замахаев — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-30004).

Благодарности. Авторы благодарят за помощь в проведении MALDI-TOF-анализа сотрудников ЦКП «Индустриальная Биотехнология» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Almagro-Moreno, S., and Taylor, R. K. (2013) Cholera: environmental reservoirs and impact on disease transmission, *Microbiol. Spectr.*, **1**, doi: 10.1128/microbiolspec.ON-0003-2012.
2. Hu, D., Liu, B., Feng, L., Ding, P., Guo, X., Wang, M., Cao, B., Reeves, P. R., and Wang, L. (2016) Origins of the current seventh cholera pandemic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E7730-E7739, doi: 10.1073/pnas.1608732113.
3. WHO. The Weekly Epidemiological Record (2021) URL: www.who.int/publications/journals/weeklyepidemiological-record (дата обращения: 18.08.2023).
4. Всемирная организация здравоохранения (11 февраля 2023 г.). Новости о вспышках болезней. Холера — ситуация в мире, URL: www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON437 (дата обращения: 18.08.2023).
5. Clemens, J., Shin, S., Sur, D., Nair, G. B., and Holmgren, J. (2011) New-generation vaccines against cholera, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **8**, 701-710, doi: 10.1038/nrgastro.2011.174.
6. Hui Xian, T., Parasuraman, S., Ravichandran, M., and Prabhakaran, G. (2022) Dual-use vaccine for diarrhoeal diseases: cross-protective immunogenicity of a cold-chain-free, live-attenuated, oral cholera vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) challenge in BALB/c mice, *Vaccines*, **10**, 2161, doi: 10.3390/vaccines10122161.
7. WHO. Cholera vaccine, URL: www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/cholera (дата обращения: 18.08.2023).
8. Ravichandran, M., Tew, H. X., Prabhakaran, G., Parasuraman, S., and Norazmi, M. N. (2022) Live, genetically attenuated, cold-chain-free cholera vaccine — a research and development journey: light at the end of a long tunnel, *Malays. J. Med. Sci.*, **29**, 1-7, doi: 10.21315/mjms2022.29.2.1.
9. Sumarov, A. A., Ivanov, N. R., Dzharidze, M. N., Rystova, E. A., Reznikov, Iu. B., et al. (1991) The characteristics of the reactogenicity and immunological activity of a new cholera bivalent chemical vaccine based on the results of controlled trials, *Zhurn. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **7**, 55-58.
10. Sumarov, A. A., Dzharidze, M. N., Eliseev, Iu. Iu., Nikitina, G. P., Poliakov, K. A., et al. (1993) The determination of the optimal inoculation dose of an oral cholera bivalent chemical vaccine in a controlled trial of the vaccination of children and adolescents, *Zhurn. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **5**, 55-60.
11. Вакцина холерная бивалентная химическая, инструкция по применению, URL: www.vidal.ru/drugs/cholera_bivalent_chemical_vaccine__42897 (дата обращения: 18.08.2023).
12. Zhang, R. G., Westbrook, M. L., Westbrook, E. M., Scott, D. L., and Otwinowski, Z. (1995) The 2.4 Å crystal structure of cholera toxin B subunit pentamer: cholera toxin B subunit pentamer, *J. Mol. Biol.*, **251**, 550-562, doi: 10.1006/jmbi.1995.0455.
13. Korotkov, K. V., Sandkvist, M., and Hol, W. G. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism, *Nat. Rev. Microbiol.*, **10**, 336-351, doi: 10.1038/nrmicro2762.

14. Overbye, L. J., Sandkvist, M., and Bagdasarian, M. (1993) Genes required for extracellular secretion of enterotoxin are clustered in *Vibrio cholerae*, *Gene*, **132**, 101-106, doi: 10.1016/0378-1119(93)90520-D.
15. Wernick, N. L., Chinnapen, D. J., Cho, J. A., and Lencer, W. I. (2010) Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum, *Toxins (Basel)*, **2**, 310-325, doi: 10.3390/toxins2030310.
16. Baldauf, K. J., Royal, J. M., Hamorsky, K. T., and Matoba, N. (2015) Cholera toxin B: one subunit with many pharmaceutical applications., *Toxins (Basel)*, **7**, 974-996, doi: 10.3390/toxins7030974.
17. Jelinek, T., and Kollaritsch, H. (2008) Vaccination with Dukoral against travelers' diarrhea (ETEC) and cholera, *Expert Rev. Vaccines*, **7**, 561-567, doi: 10.1586/14760584.7.5.561.
18. Lebens, M., Johansson, S., Osek, J., Lindblad, M., and Holmgren, J. (1993) Large-scale production of *Vibrio cholerae* toxin B subunit for use in oral vaccines, *Biotechnology*, **11**, 1574-1578, doi: 10.1038/nbt1293-1574.
19. Rhie, G. E., Jung, H. M., Park, J., Kim, B. S., and Mekalanos, J. J. (2008) Construction of cholera toxin B subunit-producing *Vibrio cholerae* strains using the Mariner-FRT transposon delivery system, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **52**, 23-28, doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00346.x.
20. Slos, P., Dutot, P., Reymund, J., Kleinpeter, P., and Prozzi, D. (1998) Production of cholera toxin B subunit in *Lactobacillus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **169**, 29-36, doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13295.x.
21. Goto, N., Maeyama, J., Yasuda, Y., Isaka, M., and Matano, K. (2000) Safety evaluation of recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant, *Vaccine*, **18**, 2164-2171, doi: 10.1016/S0264-410X(99)00337-0.
22. Zeighami, H., Sattari, M., and Rezayat, M. (2010) Cloning and expression of a cholera toxin beta subunit in *Escherichia coli*, *Ann. Microbiol.*, **60**, 451-454, doi: 10.1007/s13213-010-0062-z.
23. Dakterzada, F., Mobarez, A. M., Roudkenar, M. H., and Forouzandeh, M. (2012) Production of pentameric cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*, *Avicenna J. Med. Biotechnol.*, **4**, 89-94.
24. Slos, P., Speck, D., Accart, N., Kolbe, H. V., and Schubnel, D. (1994) Recombinant cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*: high-level secretion, purification, and characterization, *Protein Expr. Purif.*, **5**, 518-526, doi: 10.1006/prep.1994.1071.
25. Matoba, N. (2015) N-glycosylation of CHOLERA toxin B subunit: serendipity for novel plant-made vaccines? *Front Plant Sci.*, **6**, 1132, doi: 10.3389/fpls.2015.01132.
26. Hamorsky, K. T., Kouokam, J. C., Bennett, L. J., Baldauf, K. J., and Kajiura, H. (2013) Rapid and scalable plant-based production of a cholera toxin B subunit variant to aid in mass vaccination against cholera outbreaks, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**, e2046, doi: 10.1371/journal.pntd.0002046.
27. Mudrak, B., and Kuehn, M. J. (2010) Specificity of the type II secretion systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* for heat-labile enterotoxin and cholera toxin, *J. Bacteriol.*, **192**, 1902-1911, doi: 10.1128/JB.01542-09.
28. Strain — DH5α. The Coli Genetic Stock Center (CGSC). Yale University, URL: <https://cgsc.biology.yale.edu/Strain.php?ID=150015> (дата обращения: 18.08.2023).
29. Karpov, D. S., Goncharenko, A. V., Usachev, E. V., Vasina, D. V., Divisenko, E. V., Chalenko, Y. M., Pochtovyi, A. A., Ovchinnikov, R. S., Makarov, V. V., Yudin, S. M., Tkachuk, A. P., and Gushchin, V. A. (2021) A strategy for the rapid development of a safe *Vibrio cholerae* candidate vaccine strain, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 11657, doi: 10.3390/ijms222111657.
30. Quan, S., Hiniker, A., Collet, J. F., and Bardwell, J. C. (2013) Isolation of bacteria envelope proteins, *Methods Mol. Biol.*, **966**, 359-366, doi: 10.1007/978-1-62703-245-2_22.
31. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
32. Brunelle, J. L., and Green, R. (2014) One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE), *Methods Enzymol.*, **541**, 151-159, doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4.
33. GelAnalyzer 19.1, URL: www.gelalyzer.com (дата обращения: 18.08.2023).
34. Hamorsky, K., and Matoba, N. (2016) Facile method for the production of recombinant cholera toxin B subunit in *E. coli*, *Methods Mol. Biol.*, **1404**, 511-518, doi: 10.1007/978-1-4939-3389-1_33.
35. Naha, A., Mandal, R. S., Samanta, P., Saha, R. N., and Shaw, S. (2020) Deciphering the possible role of ctxB7 allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1, *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **14**, e0008128, doi: 10.1371/journal.pntd.0008128.
36. Wang, Y. (2002) The function of OmpA in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 396-401, doi: 10.1006/bbrc.2002.6657.
37. Keen, N. T., and Tamaki, S. (1986) Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC16 and their high-level expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **168**, 595-606, doi: 10.1128/jb.168.2.595-606.1986.
38. Lei, S. P., Lin, H. C., Wang, S. S., Callaway, J., and Wilcox, G. (1987) Characterization of the *Erwinia carotovora pelB* gene and its product pectate lyase, *J. Bacteriol.*, **169**, 4379-4383, doi: 10.1128/jb.169.9.4379-4383.1987.
39. Ruppert, A., Arnold, N., and Hobom, G. (1994) OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production,

- cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus, *Vaccine*, **12**, 492-498, doi: 10.1016/0264-410x(94)90305-0.
40. Low, K. O., Mahadi M. N., and Illias R. M. (2013) Optimisation of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 3811-3826, doi: 10.1007/s00253-013-4831-z.
 41. Zhou, Y., Lu, Z., Wang, X., Selvaraj, J. N., and Zhang, G. (2018) Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 1545-1556, doi: 10.1007/s00253-017-8700-z.
 42. Lee, J. H., Choi, S. Y., Jeon, Y. S., Lee, H. R., and Kim, E. J. (2009) Classification of hybrid and altered *Vibrio cholerae* strains by CTX prophage and RS1 element structure, *J. Microbiol.*, **47**, 783-788, doi: 10.1007/s12275-009-0292-6.
 43. Dertzbaugh, M. T., and Cox, L. M. (1998) The affinity of cholera toxin for Ni²⁺ ion, *Protein Eng.*, **11**, 577-581, doi: 10.1093/protein/11.7.577.
 44. Zhu, P., Stanisheuski, S., Franklin, R., Vogel, A., Vesely, C. H., Reardon, P., Sluchanko, N. N., Beckman, J. S., Karplus, P. A., Mehl, R. A., and Cooley, R. B. (2023) Autonomous synthesis of functional, permanently phosphorylated proteins for defining the interactome of monomeric 14-3-3 ζ , *ACS Cent Sci.*, **9**, 816-835, doi: 10.1021/acscentsci.3c00191.
 45. Shatov, V. M., Muranova, L. K., Zamotina, M. A., Sluchanko, N. N., and Gusev, N. B. (2023) α -Crystallin domains of five human small heat shock proteins (sHsps) differ in dimer stabilities and ability to incorporate themselves into oligomers of full-length sHsps, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 1085, doi: 10.3390/ijms24021085.
 46. Slonimskiy, Y. B., Zupnik, A. O., Varfolomeeva, L. A., Boyko, K. M., Maksimov, E. G., and Sluchanko, N. N. (2022) A primordial orange carotenoid protein: structure, photoswitching activity and evolutionary aspects, *Int. J. Biol. Macromol.*, **222**, 167-180, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.131.
 47. Янишевский Н. В., Гинцбург А. Л., Вертиев Ю. В., Демме Ю. М., Каратаев Г. И. (1987) Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез β -субъединицы холерного токсина, *Мол. Генет.*, **4**.
 48. Смирнова Н. И., Чеховская Г. В., Ливанова Л. Ф., Кобкова И. М. (2004) Штамм бактерий *Escherichia coli* КМ 147 – продуцент β -субъединицы холерного токсина, Патент на изобретение № 2238975.

DEVELOPMENT OF A HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEM AND OPTIMIZATION OF THE ALGORITHM FOR CHOLERA TOXIN β -SUBUNIT PRODUCTION IN *E. coli*

H. H. Jamgochian, M. V. Zamakhaev, N. N. Sluchanko,
A. V. Goncharenko*, and M. S. Shumkov

*Bach Institute of Biochemistry, FRC Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: pylaevanna@gmail.com*

Cholera is a deadly infection disease, which is usually associated with low hygiene levels and restricted access to high-quality drinking water. An effective way to prevent cholera is the use of vaccines. Among active vaccine components there is the CtxB protein (cholera toxin β -subunit). In the current work, we have developed a genetic system for the production of recombinant CtxB in *E. coli* cells and studied the conditions for the synthesis and purification of the target product at the laboratory culture level. It has been found that the optimal algorithm for isolation of the recombinant protein is to grow an *E. coli* culture in a synthetic M9 medium with glycerol, followed by CtxB purification out of the spent culture medium through Ni²⁺-ions affinity chromatography techniques. Forty-eight hours following CtxB expression induction, the concentration of the target product can be up to 50 mg/liter in the culture medium. The CtxB protein retains its pentameric structure while expressing and through purification. The latter makes it possible to consider the developed system as a promising tool for the industrial-level synthesis of recombinant CtxB for medical and research purposes.

Keywords: cholera toxin β -subunit, CtxB, expression, recombinant protein