



УДК 577.214.622

© 1993 К. Б. Игнатов, Л. Г. Чистякова,
О. Б. Шемчукова, С. Б. Городецкая, В. И. Киселев

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ЭНТЕРОТОКСИНА В *Staphylococcus aureus*, ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ, И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Предложен новый подход к определению энтеротоксигенности *Staphylococcus aureus*, в основе которого лежит метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). С помощью данного метода проведен скрининг штаммов *S. aureus* на наличие гена энтеротоксина В. Фрагмент ДНК выбранного штамма (FRI 722H), содержащий ген энтеротоксина В, был получен методом ПЦР и клонирован в векторе pUC19. Было показано, что энтеротоксин В с лидерным пептидом в клетках *Escherichia coli* образует нерастворимые комплексы, а зрелый токсин находится в цитоплазматической фракции в растворимом состоянии. Суммарный выход рекомбинантного токсина в *E. coli* JM109 составил 1,7% общего клеточного белка.

Стафилококковые энтеротоксины (SE) — это белки с молекулярной массой около 30 кДа. По серологическим признакам они разделены на пять групп: А, В, С, D, Е [1]. SE вызывают в организме человека и животных синдром пищевого отравления [1] и неспецифическую стимуляцию иммунитета [2]. В 60% случаев штаммы *Staphylococcus aureus*, выделенные от больных гнойно-септическими заболеваниями, продуцируют энтеротоксины типа А и В [3].

Стафилококковый энтеротоксин В (SEB) относится к числу мощных иммуностимуляторов. В низких концентрациях (10^{-12} — 10^{-9} М) он вызывает пролиферацию Т-лимфоцитов и индуцирует синтез γ -интерферона и интерлейкина-2 [4, 5]. Свойства SEB определяются его способностью связываться с $\alpha\beta$ -рецепторами Т-лимфоцитов с высокой эффективностью [6]. Благодаря своим иммуностимулирующим свойствам SEB представляет интерес в качестве основы для создания иммуностимуляторов. Аминокислотная последовательность и структура гена энтеротоксина В (*entB*-ген) были определены ранее [7, 8].

Клонированию гена SEB предшествовал выбор штамма *S. aureus*, содержащего *entB*-ген.

Способность штаммов *S. aureus* продуцировать тот или иной тип энтеротоксинов до настоящего времени определялась иммунологическими методами. Однако благодаря большой гомологии антигенных детерминант антитела, полученные к одному типу SE, дают значительную перекрестную реакцию с другими энтеротоксинами. Кроме того, один штамм стафилококка может продуцировать несколько типов энтеротоксинов. Все это не позволяет однозначно определить энтеротоксигенность штаммов *S. aureus*.

Для прямого обнаружения генов SE в геноме стафилококка нами был разработан подход на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Специфичность данного метода обнаружения определяется выбором ограничивающих олигонуклеотидных

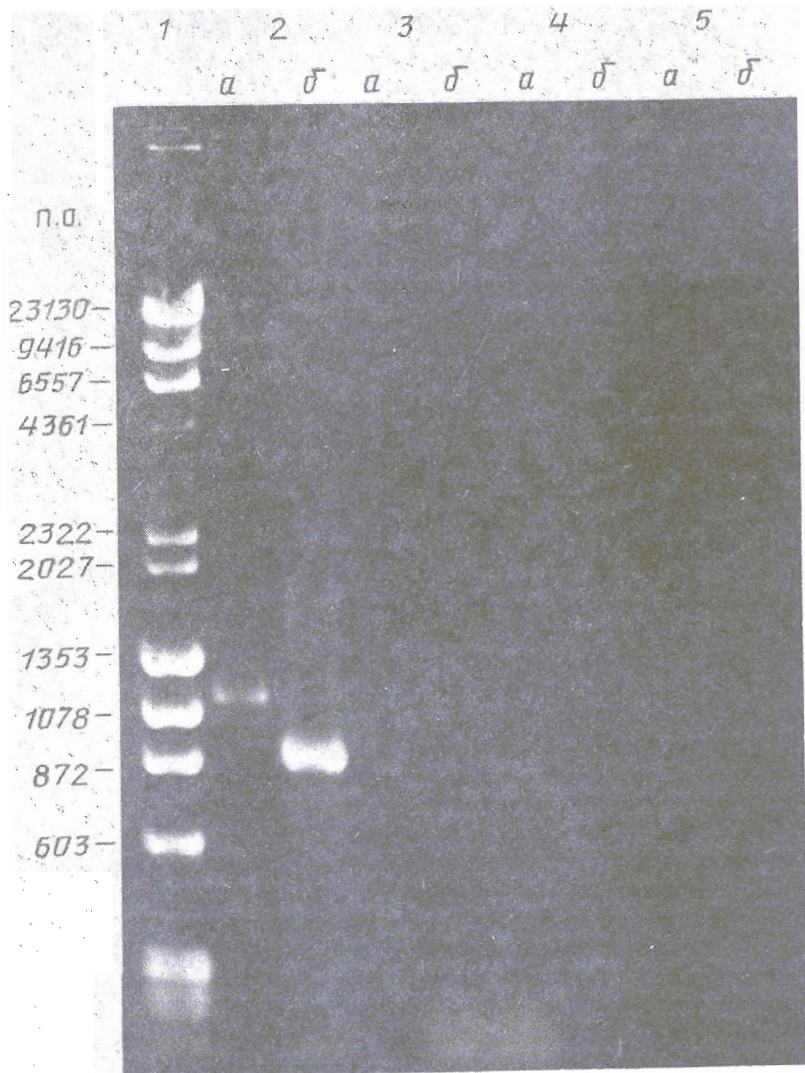


Рис. 1. Электрофорез в 1% агарозном геле образцов, полученных в результате амплификации ДНК *S. aureus* FRI 722(Н) (2), FRI 722 (3), клинического изолята к/к64 (4) и к/к87 (5) с праймерами P1/1 и P2 (а), P1/2 и P2 (б). Дорожка 1 — маркеры, мол. массы DRigest[™] III (Pharmacia)

праймеров, способных связываться только с уникальными участками ДНК, расположенными друг от друга на заданном расстоянии.

В результате анализа первичной структуры *entB*-гена по программе «PRIMER», любезно предоставленной С. Л. Васильевым, для последующего анализа генома стафилококков были выбраны следующие пары праймеров:

а) пара, ограничивающая участок ДНК длиной 1135 п. о.,

P¹/1 (5') AAAGTTTAGGTGATGTATAGTTAC

P2 (5') GTGAAAACSTATAATGGCAACA,

б) пара, ограничивающая участок ДНК длиной 877 п. о.,

P¹/2 (5') TTAGCAGAGAGTCAACCAGATCC

P2 (5') GTGAAAACSTATAATGGCAACA.

Для определения штамма *S. aureus*, содержащего ген энтеротоксина В, с помощью ПЦР были проанализированы геномные ДНК клинических изолятов

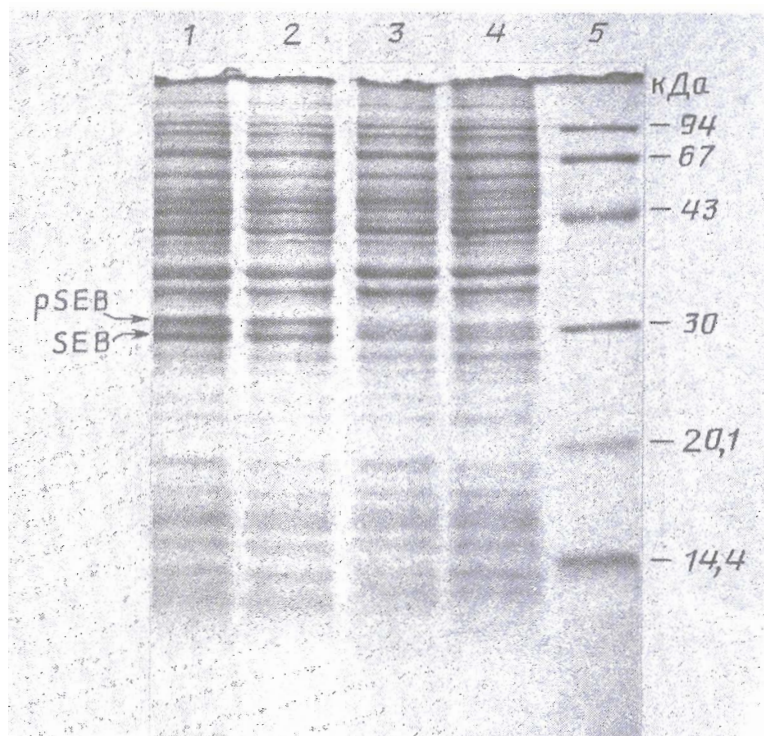


Рис. 2. Электрофорез в 12% ПААГ лизатов клеток *E. coli* с плазмидой рUC19 (4), плазмидой рUSB без индукции (3) и при индукции IPTG в течение 1 (2) и 2 ч (1). Дорожка 5 — маркеры, мол. массы

к/к 64, к/к 87 и штаммов FRI 722(H) и FRI 722. Амплификацию проводили в течение 30 циклов в следующем режиме: 93° С — 1 мин; 58° С — 1 мин; 72° С — 1 мин. Полученные образцы анализировали электрофорезом в агарозном геле (рис. 1). Специфические полосы амплификации нужной молекулярной массы (1135 и 877 п. о.) наблюдались только в препаратах, содержащих ДНК *S. aureus* FRI 722(H).

Для клонирования гена *entB* использовали геномную ДНК отобранного штамма. С помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК длиной 1135 п. о., содержащий *entB*-ген со всеми регуляторными элементами. Полимеразная реакция проводилась в режиме, описанном выше. Общее число циклов не превышало 22 для снижения вероятности внесения мутаций *Tth*-ДНК-полимеразой [9].

Так как промоторный участок гена *entB* не узнается РНК-полимеразой *E. coli* [10], для обеспечения регулируемой экспрессии ген энтеротоксина В поместили под контроль *lac*-промотора в плазмидный вектор рUC19. Чтобы обеспечить нужную ориентацию в векторе, полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК подвергали гидролизу рестриктазой *Xba*I. Участок узнавания данной рестриктазы находится между промоторной областью и SD-последовательностью *entB*-гена [8]. После гидролиза фрагмент длиной 990 п. о., содержащий полную структурную часть гена *entB*, SD-последовательность и терминатор транскрипции, выделяли из агарозного геля и лигировали с ДНК вектора рUC19, обработанной рестриктазами *Xba*I и *Sma*I. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* JM109. Отбор рекомбинантных клонов проводили на среде MacConkey с ампициллином (75 мкг/мл) и контролировали рестриктным анализом. Плазмида, содержащая ген SEB под контролем *lac*-промотора, была обозначена нами как рUSB.

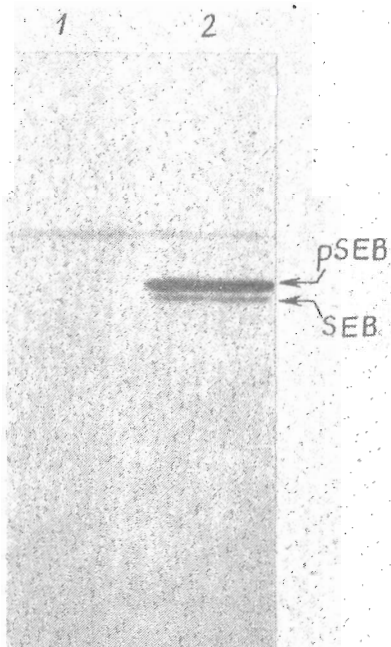


Рис. 3



Рис. 4

Рис. 3. Иммуноблоттинг лизатов клеток *E. coli* JM109, содержащих плазмиду pUC19 (1) и рекомбинантную плазмиду pUSB (2)

Рис. 4. Электрофоретический анализ белковых фракций лизатов клеток *E. coli* JM109 с рекомбинантным SEB до (3) и после центрифугирования (10 000g, 10 мин): 1 — растворимая фракция, 2 — осадочная фракция

Для обнаружения экспрессии *entB*-гена клетки *E. coli* JM109 с pUSB наращивали в среде LB с ампициллином до оптического поглощения A_{600} 0,8 при 37° С и индуцировали добавлением изопропил- β -D-тиогактопиранозидом (IPTG) до 1 мМ. Пробы для белкового электрофореза отбирали через 1 и 2 ч. В качестве контроля использовали те же клетки *E. coli* с векторной плазмидой pUC19. Электрофорез лизатов клеток *E. coli* JM109, содержащих рекомбинантную плазмиду, при индукции IPTG, выявил две полосы белка с M 31,4 кДа, что соответствует молекулярной массе энтеротоксина В с лидерным пептидом (pSEB), и белка с M 28,5 кДа, что совпадает с молекулярной массой зрелого токсина [8] (рис. 2). Оба индуцибельных белка связываются в иммуноблоттинге с моноклональными антителами S5, специфичными к энтеротоксину В (рис. 3), что позволяет идентифицировать данные белки как энтеротоксин В с лидерным пептидом и зрелый SEB.

Как известно, многие генно-инженерные белки образуют в клетках *E. coli* нерастворимые тела включения. Чтобы определить состояние рекомбинантного SEB в *E. coli*, бактериальные клетки разрушали ультразвуком и центрифугировали 10 мин при 10 000g. Электрофоретический анализ белков из осадка и надосадочной жидкости показал, что рекомбинантный SEB с лидерным пептидом (pSEB) находился в осадочной фракции, а без лидерного пептида — в растворимом состоянии (рис. 4). При обработке осадка буфером, содержащим 0,2% Triton X-100, pSEB переходил в раствор. По-видимому, предшественник энтеротоксина В находится в клетках *E. coli* в мембраносвязанном состоянии.

Суммарный выход энтеротоксина В в данной системе экспрессии определяли методом dot-ELISA, а общий клеточный белок — методом Лоури [11]. Выход рекомбинантного токсина составил 1,7% общего клеточного белка.

Экспериментальная часть

Бактериальные штаммы, использованные в работе: *E. coli* JM109 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1* λ^- , Δ (*lac* — *proAB*), F' [*traD36*, *proAB**, *lacI*^Z-M15]). *S. aureus* FRI 722 и FRI 722(H) получены из НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи; кинетические изоляты — к/к64, к/к87.

Использованы плазмиды pUC19 и pUSB (получена в процессе работы).

Геномную ДНК из *S. aureus* выделяли как описано ранее [12]. Плазмидную ДНК из клеток *E. coli* выделяли по модифицированному методу Бирнбойма и Доли [13]. Клетки *E. coli* выращивали в L-бульоне, твердая среда содержала 1,5% агара. Трансформацию клеток *E. coli* проводили по методу Ханахана [14].

Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе фирмы Perkin — Elmer Cetus. Реакционная смесь имела следующий состав: 67 мМ трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween 20; dATP, dCTP, dGTP, dTTP, каждый в концентрации 0,25 мМ; 0,3 мкг геномной ДНК; 15 пмоль каждого праймера; 2,5 ед/50 мкл Tth-ДНК-полимеразы. Общий объем смеси составлял 50 мкл. Для предотвращения испарения сверху наслаивалось минеральное масло.

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы на ДНК-синтезаторе фирмы Applied Biosystems, модель 380 В 02.

В работе были использованы следующие ферменты: ДНК-лигаза фага Т4, рестриктазы *XbaI* и *SmaI* (Pharmacia); термостабильная Tth-ДНК-полимераза, полученная в отделе молекулярной биологии ВЦМДЛ.

Для отбора рекомбинантных клонов использовалась среда MacConckey.

Препараты ДНК электрофоретически анализировались в 1% агарозном геле. Электрофоретический анализ белков проводился по методу Лэмбли [15] в градиентном (5—20%) ПААГ.

Образцы для белкового электрофореза готовили следующим образом. Клетки *E. coli* из 0,5 мл культуры осаждали центрифугированием. К осадку добавляли по 300 мкл воды и фенола (рН 7,5), тщательно ресуспендировали. После центрифугирования к фенольной фракции, содержащей белки, добавляли 5 объемов этилового спирта и инкубировали при 4° С в течение ночи. Белки собирали центрифугированием и растворяли в буфере (0,5 М трис-НСl, рН 6,8; 0,1% SDS; 20% глицерин; 0,1% бромфеноловый синий; 3,3% β -меркаптоэтанол). Перед проведением электрофореза образцы на 5 мин помещали в кипящую водяную баню.

Перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозный фильтр и иммунологический анализ осуществляли как описано ранее [16].

Моноклональные антитела S5 к стафилококковому энтеротоксину В были получены при иммунизации мышей линии BALB/с очищенным SEB. Проверка специфичности осуществлялась на стандартных энтеротоксинах А, В, С1, С2, D, Е (Serva) иммуноферментным методом.

Dot-ELISA обрабатывали на стандартном стафилококковом энтеротоксине В (Serva). На нитроцеллюлозный фильтр НА (фирма Millipore) наносили стандарт SEB в разведениях от 100 до 0,78 нг/мл, в качестве контроля использовали лизат клеток JM109 с pUC19, блокировали, обрабатывали антителами S5 и проявляли конъюгатом антител кролика против IgG мыши с пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали смесь диаминобензидина и хлорнафталя. Конечная точка титрования соответствовала концентрации SEB 1,56 нг/мл. В аналогичных условиях проводился анализ по методу dot-ELISA при раститровке лизата клеток JM109, содержащих pUSB.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Центра С. В. Виноградову и М. А. Дядченко за синтез олигонуклеотидных праймеров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bergdoll M. S. // Food-borne Infections and Intoxications/Eds Riemann H., Bryan F. L. N. Y.: Acad. Press, Inc., 1979. P. 443—493.
2. Kappler J., Kotzin B., Herron L., Gelgand E. W., Bigler R. D., Boylston A., Carrel S., Posnett D. N., Choi X., Marrack P. // Science. 1989. V. 224. P. 811—813.
3. Островский А. П. // Лабор. дело. 1975. № 4. С. 229—231.
4. Peavy D. L., Alder W. H., Smith R. T. // J. Immunol. 1970. V. 105. P. 1453—1458.
5. Lee C. L. Y., Lee S. H. S., Jay F. T., Rozee K. R. // Immunology. 1990. V. 70. P. 94—99.
6. White J., Herman A., Pullen A. M., Kubo R., Kappler J. W., Marrack P. // Cell. 1989. V. 56. P. 27—35.
7. Huang I. Y., Bergdoll M. S. // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. P. 3518—3525.
8. Jones C. L., Khan S. A. // J. Bacteriol. 1986. V. 166. P. 29—33.
9. PCR Protocols/Eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. N. Y.: Acad. Press, Inc., 1990. P. 86.
10. Ranelli D. M., Jones C. L., Johns M. B., Mussey G. J., Khan S. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 5850—5854.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265—275.
12. Betley M. J., Lofdahl S., Krelswirth B. N., Bergdoll M. S., Bovick R. P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. P. 5179—5183.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 101—102.
14. Ханахан Д. // Клонирование ДНК. Методы/Ред. Гловер Д. М.: Мир, 1988. С. 154—155.
15. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680—685.
16. Burnette W., Neal K. // Analyt. Biochem. 1981. V. 112. P. 195—203.

Поступила в редакцию
14.V.1992

K. B. IGNATOV, L. G. CHISTJAKOVA, O. B. CHEMCHUKOVA,
S. B. GORODIETSKAYA, V. I. KISELEV

CLONING OF THE *Staphylococcus aureus* ENTEROTOXIN B GENE BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION AND ITS EXPRESSION IN *Escherichia coli* CELLS

Russian Research Centre of Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow

To determine the *Staphylococcus aureus* enterotoxigenicity, we have developed an approach based on polymerase chain reaction (PCR). Using this method several *S. aureus* strains have been screened for the presence of the enterotoxin B gene. A DNA fragment of the selected strain (FRI 722H) containing enterotoxin B gene has been obtained by the PCR method and cloned in the pUC19 vector. It is shown that enterotoxin B with the leader peptide forms insoluble complexes in *E. coli* cells, whereas the mature toxin is present in cytoplasmic fraction in a soluble form. The recombinant toxin made up for 1.7% of the total cellular protein in *E. coli* JM 109 cells.