



УДК 616.931:612.017.4:612.398+577.2

© 2008

А. А. Кабернюк, О. С. Олійник, Т. А. Редчук, С. І. Романюк,
Д. В. Колибо, академік НАН України С. В. Комісаренко

Клонування генів рекомбінантних субодиниць дифтерійного токсину *Corynebacterium diphtheriae* та їх експресія в клітинах *Escherichia coli*

The diphtheria toxin is the main pathogen of Corynebacterium diphtheriae. This is a protein with molecular weight 58,360. Having penetrated into endosomes of sensitive cells, diphtheria toxin is digested into two subunits: A and B. Fragments of diphtheria toxin's gene which encode subunits A and B have been amplified from genomic DNA of Corynebacterium diphtheriae strain NCTC 10648. Plasmids containing subunit A and subunit B have been constructed using expression vector pET24a. Expression of recombinant subunits was performed in E. coli strain Rosetta (DE3) cells under control of strong T7 promoter. Recombinant proteins were purified from cell lysate under denaturing conditions by affinity chromatography. Antigen properties were confirmed by western blot analysis.

Основним фактором патогенності збудника дифтерії — бактерії *Corynebacterium diphtheriae* — є дифтерійний токсин (ДТ). Цей білок є головним протективним та діагностичним антигеном [1]. Молекула ДТ, маса якого становить 58,36 кДа, складається з 535 амінокислотних залишків. За умов проникнення токсину в ендосоми чутливих до нього клітин відбувається його розщеплення на дві субодиниці: А (від англ. active — активний) та В (від англ. binding — зв'язування). Токсин також можна розщепити на ці дві субодиниці in vitro, піддавши його м'якому впливу протеїнази за наявності відновлювачів дисульфідних зв'язків [2, 3].

Третинну структуру токсину формують три домени: С (catalytic), Т (transmembrane) та R (receptor binding). А-субодиниця сформована N-кінцевим С доменом, що виконує каталітичну функцію. В-субодиниця складається з двох доменів — Т і R, які виконують різні функції. Проміжний трансмембранний Т домен, що утворений амінокислотними залишками 205–378, відповідає за транслокацію токсину в клітину, а С-кінцевий — R домен, який утворений амінокислотними залишками 386–535, виконує функцію зв'язування з рецептором на поверхні клітини [4].

ДТ є інгібітором синтезу білка. Вплив на клітину відбувається за такою схемою: субодиниця В взаємодіє з рецептором на поверхні клітини-мішені та бере участь у транспорті

каталітичної субодиниці А в цитозоль, де остання й проявляє свою ферментативну активність. Фрагмент А каталізує трансферазну реакцію — АДФ-рибозиловання унікального амінокислотного залишку дифтаміду (похідного гістидину) в молекулі фактора елонгації трансляції білка EF-2. Це призводить до зупинки синтезу білка та загибелі клітини. Загибель відбувається переважно внаслідок апоптозу [3]. Окремі субодиниці ДТ, на відміну від нативного токсину, не мають токсичної властивості.

Оскільки ДТ є основним фактором патогенності *C. diphtheriae*, стан протидифтерійного антитоксичного імунітету впливає на ймовірність появи захворювання та особливості його перебігу.

Показано, що антитоксичні антитіла характеризуються різною протективною ефективністю залежно від їх специфічності до різних фрагментів токсину. J. M. Rolf та L. Eidels отримали панель моноклональних антитіл до ДТ і проаналізували їх протективні властивості. Найбільшу здатність нейтралізувати ДТ виявляли моноклональні антитіла, специфічні до С-кінця поліпептидного ланцюга В-субодиниці [5]. Це зумовлено тим, що С-кінцева ділянка, яка розташована в районі 482–535 амінокислотних залишків, є необхідною для зв'язування ДТ з рецептором та подальшого транспорту субодиниці А в клітину [6].

Нами раніше було показано, що загалом рівень антитіл до субодиниці А більший у сироватці крові хворих дітей, у той час як у носіїв токсигенних та нетоксигенних дифтерійних бактерій, а також у хворих на інші захворювання вищий рівень антитіл до субодиниці В [7]. Отже, характер розподілу антитіл у сироватці крові до різних субодиниць ДТ може мати важливе значення при діагностиці дифтерії та моніторингу протидифтерійного імунітету.

На сьогодні основним методом отримання ДТ є його виділення з культурального середовища токсигенного штаму *C. diphtheriae* Park-Williams 8 [8]. Недоліками такого способу отримання є потенційна небезпека, пов'язана з культивуванням мікроорганізму II рівня патогенності, яка накладає певні обмеження на технологічний процес одержання ДТ. Треба також відзначити, що для отримання субодиниць з нативного ДТ необхідна процедура протеолізу з подальшим очищенням отриманих фрагментів. Тому одержання нетоксичних рекомбінантних субодиниць ДТ, які мають антигенні властивості, що притаманні нативному ДТ, є важливим та актуальним завданням, що дозволить вирішити ряд прикладних задач. Крім того, використання як продуцента безпечного мікроорганізму *Escherichia coli* є більш простою та безпечною процедурою в порівнянні з традиційним способом одержання антигену.

Рекомбінантні А та В субодиниці можуть бути використані при створенні імунохімічних тест-систем для діагностики дифтерії для оцінки рівня захисного протидифтерійного імунітету. Субодиниця В може бути також перспективним антигеном для імунізації коней з метою отримання протидифтерійної антитоксичної сироватки.

Матеріали та методи. Нуклеотидну послідовність, що кодує субодиницю А, ампліфіковано методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням двох пар олігонуклеотидних праймерів: Sense SbA1 — 5'-GGC GCT GAT GAT GTT GTT GAT TC-3'; Antisense SbA1 — 5'-ACG ATT TCC TGC ACA GGC TTG-3'; Sense SbA2 — 5'-GGATCC GGC GCT GAT GAT GTT G-3'; Antisense SbA2 — 5'-CTCGAG ACG ATT TCC TGC ACA GG-3'. У послідовність другої пари праймерів були введені сайти рестрикції ендонуклеаз *Bam*HI та *Xho*I відповідно (підкреслено в наведеній послідовності праймерів).

Для ампліфікації нуклеотидної послідовності, що кодує субодиницю В, використано одну пару олігонуклеотидних праймерів: Sense SbB — 5'-GGATCC GGT AGC TCA TTG TCA GGC ATA AAT CTT G-3' та Antisense SbB — 5'-CTCGAG GCT CTT GAT TTC AAA

AAA TAG CGA TAG C-3' ("Fermentas", Литва), у послідовність яких було введено сайти рестрикції ендонуклеаз *Bam*HI та *Xho*I відповідно (підкреслено в наведеній послідовності праймерів). Як матрицю для ампліфікації цільової послідовності використано геномну ДНК мікроорганізму *Corynebacterium diphtheriae*, штам NCTC 10648. Підбір послідовності праймерів та температурного режиму ПЛР здійснено з використанням програми Vector NTI 8.0. Реакцію проводили на термоциклері 2720 Thermal Cycler ("Applied Biosystems", США)

Конструювання експресійних векторів проводили з використанням плазміди pET-24a(+) ("Novagen", США). Вектори для експресії pET-24a-SubunitA, pET-24a-SubunitB були отримані в результаті реакції лігування вставки — продукту ПЛР та плазміди pET-24a (+). Плазмиду та вставку попередньо гідролізували ендонуклеазами II типу *Bam*HI та *Xho*I ("Fermentas", Литва) та очищували з агарозного гелю. Для очищення використовували набір реактивів ("DNA extraction Kit", "Fermentas"). Реакцію лігування проводили з використанням T4 ДНК лігази ("Fermentas"). Трансформацію клітин *E. coli* отриманою експресійною конструкцією здійснювали шляхом електропорації за допомогою електропоратора ("Electroporator 2510, Eppendorf", ФРН). Усі процедури виконували згідно з рекомендаціями виробників.

Експресію рекомбінантних білків проводили в штамі *E. coli* Rosetta(DE3). Бактеріальна культура нарощувалася при 37 °C за умов сильної аерації (250 об/хв) до значення оптичної густини OD₆₀₀ — 0,5–1,0 у середовищі 2YT (на 1 л: 17 г бактотриптон, 10 г дріжджового екстракту, 5 г NaCl), яке містило 2% глюкози, 50 мг/л канаміцину та 170 мг/л хлорамфеніколу. Експресію білка індукували заміною культурального середовища на 2YT-KChI, яке містило 1 мМ ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (IPTG) ("Fermentas"). Після індукції експресії культуру інкубували 3 год при 30 °C за умов сильної аерації (250 об/хв), після чого клітини відділяли від культурального середовища центрифугуванням.

Виділення рекомбінантних субодиниць здійснювали методом металафінної хроматографії з використанням Ni-NTA агарози ("Sigma", США). Осаджені з 10 мл бактеріальної культури клітини ресуспендували в 1 мл лізис-буфера (50 мМ Na₂HPO₄, pH 8,0, 0,3 М NaCl) та обробляли ультразвуковим дезінтегратором ("Sartorius LabsonicM", Німеччина). Залишки клітин осаджували центрифугуванням, а супернатант переносили в мікропробірку з попередньо зрівноваженими 100 мкл Ni-NTA агарози. Зрівноваження афінного сорбенту проводили двічі, відмиваючи 100 мкл 50% суспензії Ni-NTA агарози, 1,5 мл H₂O та двічі 1,5 мл буфером W (50 мМ Na₂HPO₄, pH 8,0, 0,5 М NaCl); для зміни буфера агарозу осаджували центрифугуванням 3 хв за 4000 об/хв. Зв'язування білка з афінним сорбентом проводили протягом 1 год при 37 °C. Після осадження Ni-NTA агарози сорбент двічі промивали буфером W з 10 мМ імідазолом ("Sigma"). Білок елюювали тричі, промиваючи сорбент буфером E (20 мМ Tris, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 250 мМ імідазол). У випадку, коли виділення здійснювали за денатуруючих умов, додатковим компонентом буферів, що використовувались при виділенні білка, була 8 М сечовина.

Чистоту отриманого продукту аналізували методом електрофорезу в 10% ДСН-ПААГ за Н. Schagger [9]; концентрацію виділеного білка визначали за допомогою методу М. Bradford [10].

Для синтезу кон'югату використано F(ab)₂-фрагменти з протидифтерійної сироватки коня ("НВО"Микроген", Росія). Кон'югацію проводили за допомогою періодатного методу за Р. Nakane [11]. Отриманий кон'югат очищали шляхом трикратного висолювання сульфатом амонію [12]. Активність і специфічність кон'югату перевіряли за допомогою непрямого імуноферментного аналізу [13].

Для імуноблот аналізу використовували нітроцелюлозу Hybond-C Extra (“Amersham Biosciences”), перенесення білків з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану проводили методом напіссухого перенесення за допомогою Hoefer TE 70 (“Amersham Biosciences”). Буфер для перенесення містив 25 мМ Tris, 192 мМ гліцин, 0,1% додецил сульфат натрію, 20% метанол. Нітроцелюлоза після перенесення “блокувалася” знежиреним молоком (5%) у забуференому фізіологічному розчині протягом 1 год при 37 °С. Для проявлення мембрани використовували кон’югат F(ab)₂-фрагментів антитіл коня проти дифтерійного токсину з пероксидазою хрому. Як хромогенний субстрат використовували 3,3'-діамінобензидин тетрагідрохлорид (DAB) (“Sigma”) з контрастуванням хлоридом кобальту: 1 мл 0,3% CoCl₂ (у буфері 50 мМ Tris, рН 7,6) і DAB — 6 мг в 9 мл того ж буфера. До суміші додавали 10 мкл 30% H₂O₂.

Результати дослідження та їх обговорення. Нами отримані бактерії — продуценти окремих “неактивних” субодиниць ДТ. Для цього були створені рекомбінантні конструкції на основі експресійного вектора рЕТ-24a(+), що кодуєть рекомбінантні субодиниці А та В, кон’юговані з полігістидиновим “тагом” (таг — послідовність, що складається з шести розташованих поспіль амінокислотних залишків гістидину).

Нуклеотидні послідовності, що кодуєть субодиниці ДТ, ампліфіковано з геномної ДНК *C. diphtheriae*, штам NCTC 10648. Для ампліфікації послідовності ДНК для субодиниці А використано дві пари олігонуклеотидних праймерів, а для ампліфікації субодиниці В — одну пару олігонуклеотидних праймерів.

При ампліфікації гена субодиниці А отримано нуклеотидну послідовність частини гена дифтерійного токсину завдовжки 582 п. н., яка кодує амінокислотну послідовність завдовжки 190 залишків.

Для ампліфікації гена субодиниці В праймери підібрали таким чином, щоб не включити в продукт ампліфікації стоп-кодон та замінити цистеїн у шостому положенні, що бере участь у формуванні дисульфідного зв’язку між субодиницею А та субодиницею В, на гліцин. Продукт ампліфікації містив частину гена, що кодує субодиницю В (661–1680 п. н.). Довжина поліпептидного ланцюга, що кодується даною частиною гена, складається з 340 амінокислотних залишків, які розташовані на С-кінці молекули ДТ.

Наявність в рекомбінантних конструкціях фрагментів очікуваного розміру підтверджено рестрикційним аналізом за допомогою ендонуклеаз *Vam*HI та *Xho*I. За допомогою рестриктази *Vfm*I, що специфічно гідролізує нуклеотидні послідовності обох субодиниць — кожен на два фрагменти (завдовжки 202 і 374 п. н. — субодиниця А та 810 і 200 п. н. — субодиниця В), підтверджено наявність в обох рекомбінантних конструкціях послідовностей, що кодуєть субодиниці А та В (рис. 1).

Секвенс конструкцій, проведений Українською лабораторією якості і безпеки продукції АПК Національного аграрного університету, продемонстрував 99% тотожності отриманих послідовностей з відповідними послідовностями гена ДТ. Порівняння проведено за допомогою програми NCBI Blast. Неповна ідентичність може бути зумовлена як поліморфізмом гена, так і помилками Таq полімерази при ампліфікації нуклеотидних послідовностей.

Для виділення рекомбінантного білка використано метод металафінної хроматографії. Зважаючи на те що цільовий продукт переважно знаходиться в нерозчинній формі, виділення проводили за денатуруючих умов з використанням 8 М сечовини. Чистоту отриманого білка було підтверджено електрофоретичним аналізом (рис. 2). Загальний вихід продукту становив 15 мг та 10 мг на 1 л клітинної суспензії для субодиниці А та В відповідно. Оцінку кількості продукту здійснювали методом Bradford.

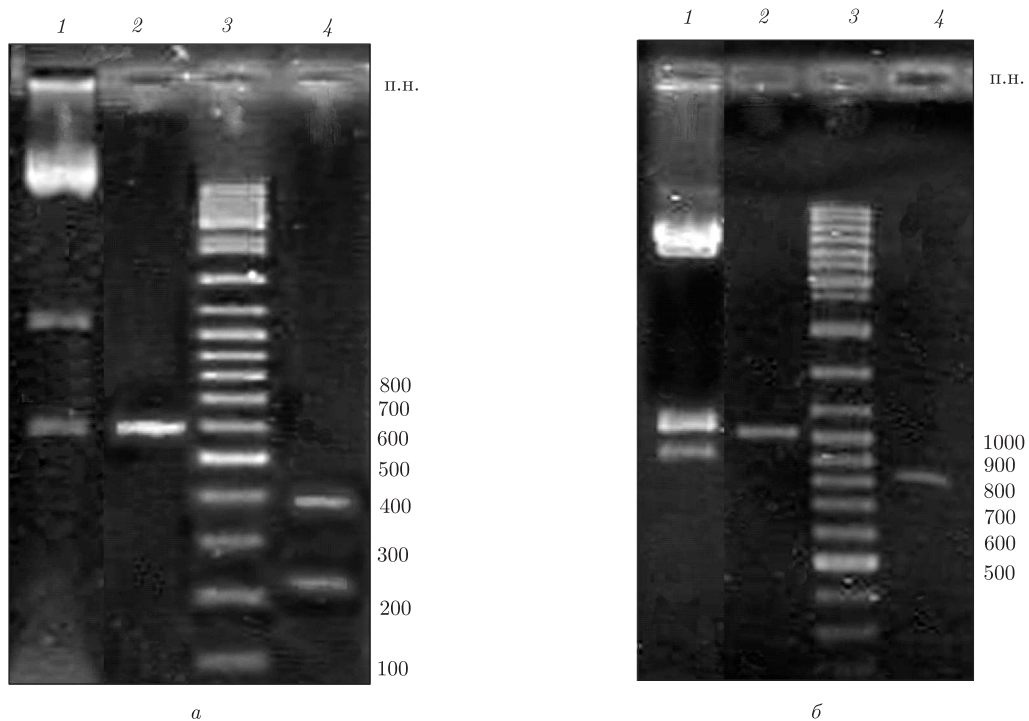


Рис. 1. Рестрикційний аналіз отриманих генетичних конструкцій на основі рЕТ-24а(+), що містили фрагменти гена дифтерійного токсину, які кодують субодиниці А (а) та В (б):
 1 — продукти рестрикції плазмідної ДНК рестриктазами *Bam*HI, *Xho*I; 2 — виділена з агарозного гелю вставка; 3 — ДНК маркер; 4 — продукти рестрикції вставки рестриктазою *Bfm*I

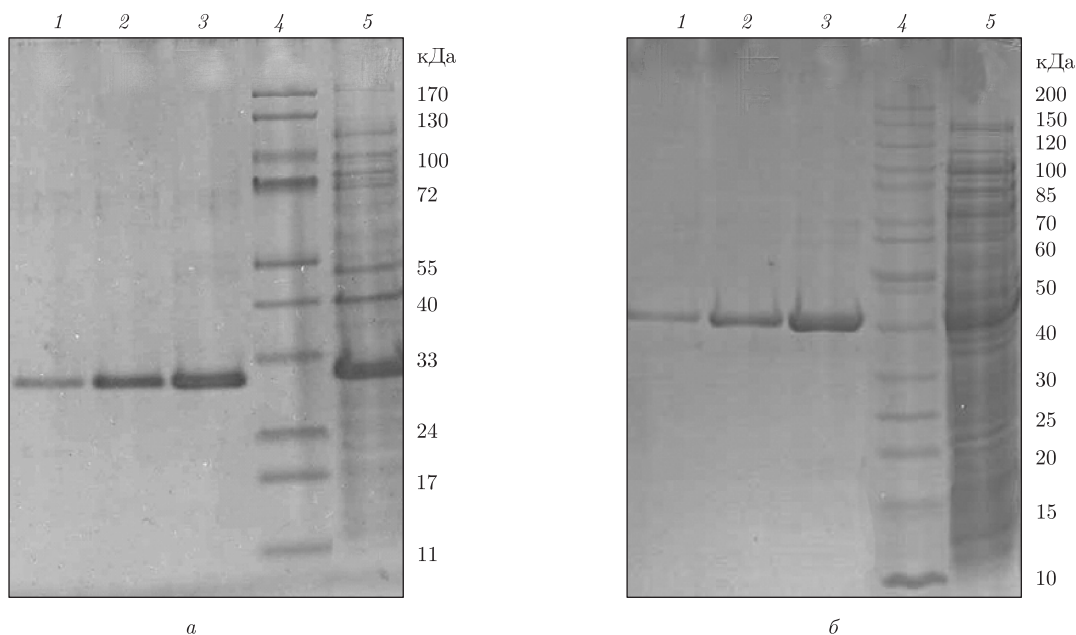


Рис. 2. Електрофореграми рекомбінантних субодиниць А (а) та В (б), які виділено методом металафінної хроматографії:
 1, 2, 3 — різні фракції виділеного цільового продукту; 4 — маркери молекулярної маси; 5 — тотальний лізат клітин штаму-продуцента

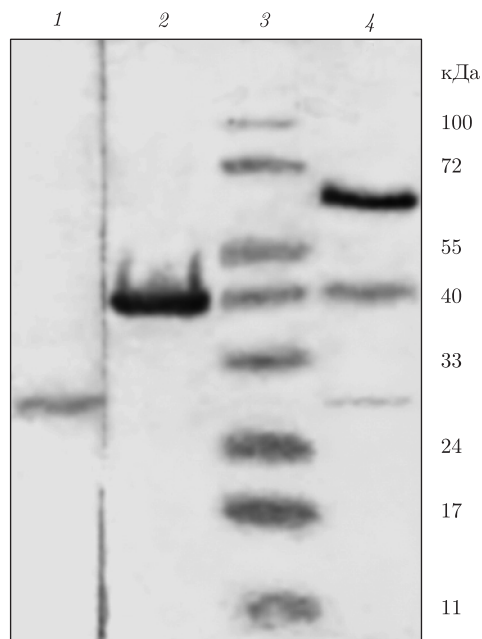


Рис. 3. Блотограма очищених рекомбінантних субодиниць та дифтерійного токсину.
 1 — рекомбінантна субодиниця А; 2 — рекомбінантна субодиниця В; 3 — маркери молекулярної маси; 4 — дифтерійний токсин

Для підтвердження антигенних властивостей рекомбінантних субодиниць ДТ проведено імуноблот аналіз. Для цього нами було використано кон'югат $F(ab)'_2$ -фрагментів протидифтерійної сироватки коня з пероксидазою хрому. Як контрольний антиген використано ДТ, люб'язно наданий професором Ю. Л. Радавським (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України). Результати аналізу (рис. 3) показують, що рекомбінантні субодиниці мають притаманні ДТ антигенні властивості.

Проте треба відзначити, що рекомбінантна субодиниця В краще, ніж субодиниця А, розпізнається $F(ab)'_2$ -фрагментами протидифтерійної сироватки коня. Це можна пояснити особливостями отримання протидифтерійної сироватки коня та відмінностями антигенних властивостей субодиниць ДТ.

Отримані нами рекомбінантні субодиниці ДТ можуть бути використані як антигени при розробці нових тест-систем для моніторингу протидифтерійного імунітету серед населення та для оцінки стану імунітету під час перебігу хвороби. Також може бути перспективним використання рекомбінантної субодиниці В для формування протективного протидифтерійного імунітету.

1. Schlessinger D., Schaechter M. Bacterial toxins // Mechanisms of microbial disease. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. – P. 162–175.
2. Езенчук Ю. В. Патогенность как функция биомолекул. – Москва: Медицина, 1985. – 235 с.
3. Здановский А. Г., Здановская М. В., Янковский Н. К. Структура и функции дифтерийного токсина // Молекуляр. генетика. – 1993. – № 1–2. – С. 3–10.
4. Choe S., Bennett M. J., Fujii G. The crystal structure of diphtheria toxin // Nature. – 1992. – **357**, No 6375. – P. 216–222.
5. Rolf J. M., Eidels L. Structure-function analyses of diphtheria toxin by use of monoclonal antibodies // Infect. and Immun. – 1993. – **61**, No 3. – P. 994–1003.

6. *Rolf J. M., Eidels L.* Characterization of the diphtheria toxin receptor-binding domain // *Mol. Microbiol.* – 1993. – **7**, No 4. – P. 585–91.
7. *Романюк С. И., Колибо Д. В., Кавун Э. М., Радавский Ю. Л., Ткаченко Т. Ю., Крамарев С. А., Комиссаренко С. В.* Специфичность антител к субъединицам дифтерийного токсина у детей с различным диагнозом // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – **73**, № 6. – С. 73–76.
8. *Lampidis T., Barksdale L.* Park-Williams number 8 strain of *Corynebacterium diphtheriae* // *J. Bacteriol.* – 1971. – **105**, No 1. – P. 77–85.
9. *Schagger H., Von Jagow G.* Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa // *Anal. Biochem.* – 1987. – **166**. – P. 368–379.
10. *Bradford M. A.* Rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Ibid.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
11. *Nakane P. K., Kawaoi A.* Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // *J. Histochem. and Cytochem.* – 1974. – **22**, No 12. – P. 1084–1091.
12. *Harlow E., Lane D.* *Antibodies: a laboratory manual.* – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p.
13. *Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. – Москва: Высш. шк., 1991. – 288 с.

*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 13.08.2007