

Клонирование и экспрессия гена *SPAA* *Erysipelothrix rhusiopathiae* в *Escherichia coli*

О. Н. Дерябин, Е. Г. Дерябина, П. В. Гильчук¹

Институт ветеринарной медицины НААН Украины
Ул. Донецкая, 30, Киев, Украина, 01151

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

don.lmb@gmail.com

Цель. Клонировать ген *SPAA* – поверхностный антиген *Er. rhusiopathiae* – в плазмидный вектор и экспрессировать белок *SpaA* в *E. coli*. **Методы.** Расчет и синтез олигонуклеотидных праймеров, полимеразная цепная реакция, клонирование, экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*, электрофорез в агарозе и полиакриламидном геле. **Результаты.** Полноразмерный и усеченный ген *SPAA* *Er. rhusiopathiae* клонирован в экспрессирующую плазмиду рЕТ24a(+). Экспрессия полного гена не сопровождается наработкой значительного количества рекомбинантного белка, предположительно, вследствие его токсичности для клеток *E. coli*. Элиминация из полноразмерного гена фрагмента, кодирующего насыщенную пролином область, и домена тандемных повторов, а также получение усеченного варианта гена приводят к устойчивому синтезу рекомбинантного продукта с ожидаемой молекулярной массой. **Выводы.** Получена рекомбинантная плазида, содержащая фрагмент гена *SPAA* *Er. rhusiopathiae*, что позволяет выделять в препаративных количествах в *E. coli* рекомбинантный белок с м. м. 47 кДа.

Ключевые слова: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, ген *SPAA*, рекомбинантный белок.

Введение. Грамположительная бактерия *Er. rhusiopathiae* принадлежит к семейству *Corynebacteriaceae* и является возбудителем заболевания – рожи свиней (*Erysipelas suum*). Возбудитель проявляет высокую устойчивость во внешней среде, где источником и резервуаром инфекции служат многие виды животных (свиньи, овцы, крупный рогатый скот, собаки, куры, утки, грызуны, рыбы, раки и т. д.). Основной способ борьбы с данным заболеванием – это иммунопрофилактика с использованием вакцин на основе живых авирулентных штаммов возбудителя или инактивированных вакцин на основе бактеринов или лизатов патогенных штаммов. Главную роль в формировании устойчивого про-

теktivного иммунитета при роже свиней играют специфические антитела [1].

Живые аттенуированные и инактивированные вакцины с разной эффективностью защищают животных от острой, но не хронической формы заболевания и способны вызывать реакции по типу гиперчувствительности второго типа. Малоизученными остаются вопросы бактерионосительства и эволюционной изменчивости возбудителя на фоне продолжительного и масштабного применения традиционных вакцин; выделение бактерий в окружающую среду, где возбудитель длительное время сохраняется и даже размножается в почве, а также пассируется через организм грызунов, в популяции которых проходит селекцию по признакам вирулентности.

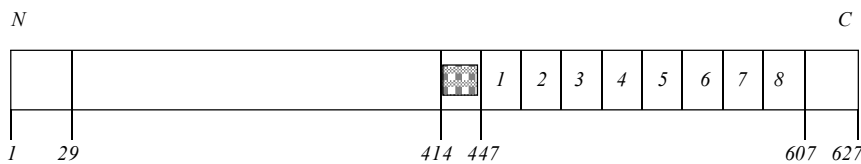


Рис. 1. Схематическая диаграмма доменной структуры молекулы белка SpaA: 1–29 а. о. – сигнальная последовательность; 29–414 – вариабельный домен, 414–447 – насыщенная пролином область; 447–626 – домен tandemных повторов

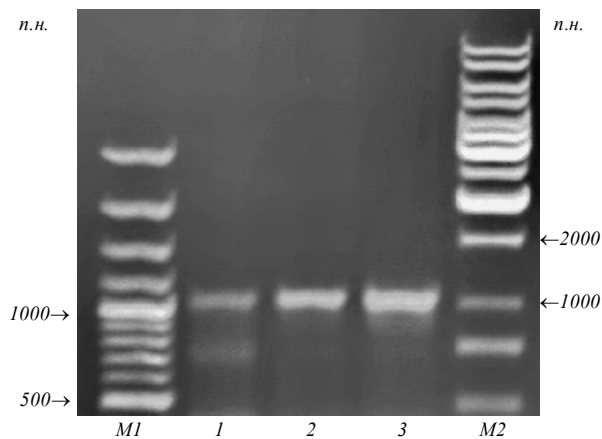


Рис. 2. Электрофореграмма амплифицированных в ПЦР с праймерами spa_652(388) и spa_652(1241) фрагментов (1085 п. н.) гена SPAА 3 штаммов *Er. rhusiopathiae*: M1 – маркер размера ДНК «100bp Plus DNA Ladder» («Fermentas», Lithuania); 1 – штамм «К»; 2 – штамм «149»; 3 – штамм «М-2ВК»; M2 – маркер «1 kbp DNA Ladder» («Fermentas»)

Преимуществом вакцин на основе рекомбинантных антигенов является их полная безопасность для животных и человека, а также отсутствие загрязнения окружающей среды.

У *Er. rhusiopathiae* описаны несколько поверхностных белков, один из которых – протективный антиген SpaA [2–4], продуцирующийся всеми штаммами бактерий *Er. rhusiopathiae* [5–7].

Ген белка SpaA кодирует полипептид с молекулярной массой (м. м.) 64–69 кДа, состоящий из 597 аминокислотных остатков (а. о.) и 29 а. о. сигнальной последовательности (рис. 1).

Цель настоящей работы состояла в клонировании гена белка SpaA *Er. rhusiopathiae* в плазмидный вектор и получении рекомбинантного продукта в системе *E. coli*.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы бактерии *Er. rhusiopathiae* из коллекции Института ветеринарной медицины НААН Украины: «М-2ВК» (вакцинный), «149» (вирулентный для мышей, голубей и свиней), «К» (патогенный местный изолят).

Ген SPAА и его усеченный фрагмент – без сигнальной последовательности и области tandemных повторов – получены в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием оригинальных праймеров Bam625_F (5'-GCGGATCCATGAAAAA GA AAAAACAC-3') и Sal625_R (5'-GCTGTGCACTT TAAACTTCCATCGTTC-3') для полного гена, а для фрагмента гена SpaA – Bam625trF (5'-GCGGAT CCATGACTGATGCTTATATTG-3') и Sal625trR 5'-GCTGTGCACTGACTTTTCAGGCTCT-3'. Секвенирование фрагментов гена SPAА выполняли с применением праймеров: spa652(388) (5'-ACCTAGC AACTAGAATCGGC-3'), spa652(795) (5'-GAACT TTATGCTATGCGGAG-3') и spa652(1241) (5'-AGT AGAGCCTGAAAGTCCCG-3') в Институте молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Полученные в ПЦР продукты клонировали в плазмиды *pUC19* (полный ген) или *pJET* (усеченный ген) с последующим переклонированием в экспрессирующую плазмиду *pET24a(+)*. Рекомбинантные белки экспрессировали в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) с помощью аутоиндукции [8], выделение телец включения осуществляли согласно методике [9], полученный материал растворяли в 6 М мочеvine и очищали методом аффинной хроматографии [10] с анализом результатов методом электрофореза в ПААГе.

Результаты и обсуждение. Вначале амплифицировали гены SPAА штаммов «К» (1881 п. н.) и «М-2ВК» (до 2300 п. н. за счет наличия в гене инсерции в области tandemных повторов) [11].

Трансфекция компетентных клеток *E. coli* штамма XL-1 с последующей наработкой и выделением рекомбинантной плазмиды и ее рестрикционный анализ подтвердили наличие вставки, соответствующей по размеру и специфическим сайтам рестрикции гену SPAА. Однако экспрессия белка SpaA с использованием рекомбинантных плазмид *pET24a(+)*, несущих гены SPAА указанных штаммов *Er. rhu-*

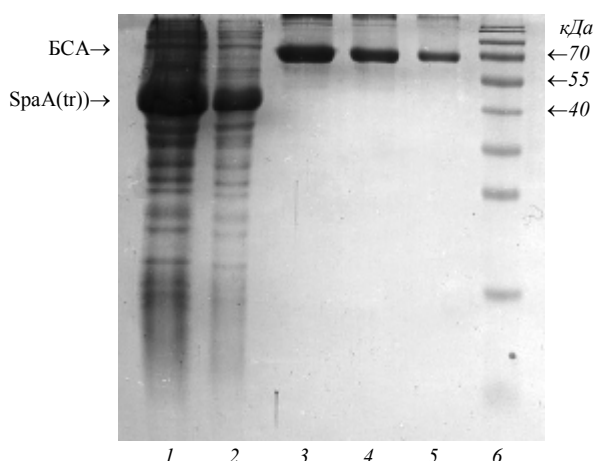


Рис. 3. Электрофореграмма образцов лизатов клеток *E. coli*, в которых индуцирован синтез белка SpaA(tr) с м. м. 47 кДа методом аутоиндукции. Варианты: 1, 2 – лизаты клеток (нанесено 0,010 и 0,002 см³ суспензии бактериальных клеток соответственно); 3–5 – БСА (нанесено – 3, 1,5 и 0,75 мкг соответственно); 6 – маркеры PageRuler(tm) Prestained Protein Ladder Fermentas

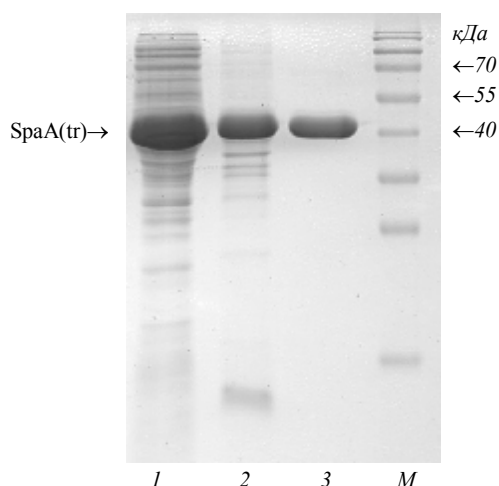


Рис. 4. Электрофореграмма образцов с основных этапов получения рекомбинантного белка SpaA(tr): 1 – общий лизат клеток *E. coli*; 2 – тельца включения; 3 – аффинно очищенный рекомбинантный белок SpaA; 4 – маркеры PageRuler(tm) Prestained Protein Ladder Fermentas

siopathiae, оказалась слабой. Предположительно, незначительное накопление продукта связано с его токсичностью для клеток *E. coli*. Исходя из предположения о том, что гидрофобная область tandemных повторов белка SpaA не влияет на формирование его антигенной уникальности, было принято решение получить усеченный ген *SPAA*. Для этого в ПЦР выделен полноразмерный ген *SPAA* штамма «149», последующее секвенирование подтвердило

его идентичность гену *SPAA* референтного штамма Fujisawa (серотип 1a) *Er. rhusiopathiae*. На нем, как на матрице, синтезировали усеченный ген *SPAA* без сигнальной последовательности и области tandemных повторов (рис. 2). Полученный фрагмент клонировали по тупым концам в плазмиду pJET и переклонировали по сайтам *Bam*HI-*Sal*I в плазмиду pET24a(+).

В усеченной форме белка SpaA(tr) были удалены а.а. с 1 по 29 и с 413 по 625. После клонирования на С-конце белка присоединены еще 6 гистидинов из вектора pET24.

Параллельно проводили экспрессию рекомбинантного продукта с использованием метода аутоиндукции и индукции ИПТГ. В обоих случаях наблюдается синтез в виде телец включения рекомбинантного белка с молекулярной массой 47 кДа SpaA(tr), соответствующей ожидаемой (рис. 3). Однако метод аутоиндукции обеспечивает большее накопление рекомбинантного продукта.

Экспрессированный рекомбинантный белок очищали методом иммобилизованной металлхелатирующей хроматографии в денатурирующих условиях (рис. 4).

Таким образом, показано, что элиминация tandemных повторов из гена *SPAA* способствует синтезу рекомбинантного белка, что подтверждает предположение об их роли в придании токсичности продукту полноразмерного гена для клеток *E. coli*.

Выводы. Клонированы полноразмерный ген *SPAA* штаммов «М-2ВК» и «К» *Er. rhusiopathiae*, а также усеченный ген *SPAA* штамма «149» *Er. rhusiopathiae* без сигнальной последовательности и области tandemных повторов.

Использование рекомбинантных плазмид, несущих вставку полноразмерного гена *SPAA* *Er. rhusiopathiae*, сопровождается синтезом токсичного для клеток *E. coli* рекомбинантного продукта.

С использованием рекомбинантной плазмиды, несущей усеченный ген *SPAA* *Er. rhusiopathiae*, синтезирован в *E. coli* рекомбинантный белок SpaA(tr) с молекулярной массой 47 кДа.

Наиболее эффективным методом индукции синтеза рекомбинантного белка является аутоиндукция.

O. M. Deriabin, O. G. Deryabina, P. V. Gilchuk¹

Cloning and expression of *Erysipelothrix rhusiopathiae* SPAA gene in *Escherichia coli*

Institute of Veterinary Medicine NAAS of Ukraine
30, Donetska Str., Kyiv, Ukraine, 03151

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150, Akademika Zabolotnoho Str., Kyiv, Ukraine, 03680

Summary

Aim. Cloning of *Er. rhusiopathiae* surface antigen – SPAA gene into plasmid vector and its expression in *E. coli*. **Methods.** Oligonucleotide primers design and synthesis, polymerase chain reaction, cloning, recombinant proteins expression in *E. coli*, electrophoresis in agarose, PAGE. **Results.** The full-size and truncated *Er. rhusiopathiae* SPAA genes were cloned into expression plasmid pET24a(+). The expression of full-size gene didn't result in significant recombinant protein production, presumably due to its toxicity for *E. coli* cells. The elimination of fragment coding for proline-rich region and tandem repeats domain from full-size gene led to production truncated variant of recombinant protein with expected molecular mass. **Conclusions.** The recombinant plasmid containing fragment of *Er. rhusiopathiae* SPAA gene was constructed. It allows obtaining preparative amount recombinant protein with m. m. 47 kDa in *E. coli*.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, SPAA gene, recombinant protein.

O. M. Дерябін, О. Г. Дерябіна, П. В. Гільчук

Клонування та експресія гена SPAA *Erysipelothrix rhusiopathiae* в *Escherichia coli*

Резюме

Мета. Клонувати ген SPAA – поверхневий антиген *Er. rhusiopathiae* – у плазмідний вектор та експресувати білок SpaA в *E. coli*. **Методи.** Розрахунок і синтез олігонуклеотидних праймерів, полімеразна ланцюгова реакція, клонування, експресія рекомбінантних білків у *E. coli*, електрофорез в агарозі та поліакриламідному гелі. **Результати.** Повнорозмірний і усічений ген SPAA *Er. rhusiopathiae* клоновано в експресуючу плазмиду pET24a(+). Експресія повного гена не супроводжується синтезом значної кількості рекомбінантного білка, очевидно, внаслідок його токсичності для клітин *E. coli*. Елімінація з повнорозмірного гена фрагмента, що кодує насичену проліном ділянку, і домену тандемних повторів, а також одержання усіченого варіанта гена призводять до стабільного синтезу рекомбінантного продукту з очікуваною молекулярною масою. **Висновки.** Отримано рекомбінантну плазмиду, яка містить фрагмент гена SPAA *Er. rhusiopathiae*, що дозволяє виділяти у препаративних кількостях в *E. coli* рекомбінантний білок з м. м. 47 кДа.

Ключові слова: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, ген SPAA, рекомбінантний білок.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Wood R. L., Straw S., D'Allaire W. L., Wood R. L. Erysipelas // Diseases of swine. 8th ed.–Iowa: State University Press, Ames, 1999.–P. 419–430.
2. Kitajima T., Oishi E., Amimoto K., Satoshi U., Nakamura H., Oda K., Katayama S., Izumida A., Shimizu Y. Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response // J. Vet. Med. Sci.–2000.–62, N 10.–P. 1073–1077.
3. Fidalgo S. G., Riley T. V. Detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in clinical and environmental samples // Meth. Mol. Biol.–2004.–268.–P. 199–205.
4. Ho To., Hagai S. Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* // Clin. Vaccine Immunol.–2007.–14, N 7.–P. 813–820.
5. Makino S. I., Yamamoto K., Asakura H., Shirahata T. Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces // FEMS Microbiol. Lett.–2000.–186, N 2.–P. 313–317.
6. Sawada T., Takahashi T. Cross protection of mice and swine inoculated with culture filtrate of attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* and challenge exposed to strains of various serovars // Am. J. Vet. Res.–1987.–48, N 2.–P. 239–242.
7. Sato H., Miyazaki H., Sakakura H., Suzuki T., Saito H., Maehara N. Isolation and purification of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* // Zentralbl. Veterinarmed.–1999.–46, N 2.–P. 73–84.
8. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif.–2005.–41, N 1.–P. 207–234.
9. Galan J. E., Timoney J. F. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* // Infect. Immun.–1990.–58, N9.–P. 3116–3121.
10. Liu M., Wang X., Yin C., Zhang Z., Lin Q., Zhen Y., Huang H. One-step on-column purification and refolding of a single-chain variable fragment (scFv) antibody against tumour necrosis factor alpha // Biotechnol. Appl. Biochem. – 2006. – 43, Pt. 3. – P.137-145.
11. Obrazhey A., Deriabin O., Tarasov O., Deryabina O. Analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* protein SpaA gene polymorphism // Interagency thematic scientific digest «Veterinary Medicine».– Kharkiv, 2007.–88.–P. 161–166.

UDC 619:616.988:616-076

Received 30.05.11