

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.218

В. Д. ІВАНОВА, В. К. ПОЗУР

ОПТИМІЗАЦІЯ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО ПЛАСТИВЦЕВОУТВОРЮЮЧОГО ФАКТОРА *Staphylococcus aureus* У КЛІТИНАХ *Escherichia coli* XLI-BLUE

Проведені експерименти по оптимізації експресії клонированного в составе вектора pQE30 гена *clfA* *Staphylococcus aureus*, кодированного хлопьеобразующий фактор (плазмида pCF41). Для экспресии гена использован штам-реципиент XLI-Blue *Escherichia coli*. Показано, что в процессе культивирования штамма-продуцента происходит элиминация плазмиды и снижение уровня биосинтеза целевого белка. Предложены способы, позволяющие повысить эффективность экспресии гена и увеличить выход продукта, подобрана питательная среда для культивирования продуцента. В предложенных условиях культивирования при индукции изопропилтио- β -D-галактозидом в рекомбинантном штамме накапливаются большие количества белка (не менее 30% всех клеточных белков), находящегося как в растворимой форме, так и в виде телец включения. Наличие на N-конце белка фрагмента из 6 остатков гистидина позволяет очищать его на колонке с IDA-сефарозой с высоким выходом.

К л ю ч е в ы е с л о в а : хлопьеобразующий фактор, *Staphylococcus aureus*, стабильность плазмиды, экспресия.

У клітинній стінці *Staphylococcus aureus* знаходиться багато адгезинів, які беруть участь у колонізації тканин та ініціації інфекцій. Пластівцеутворюючий фактор (ПлФ, clumping factor, ClfA), який взаємодіє з фібриногеном, вважають [1–3] основним фактором адгезії цих бактерій, що сприяє виникненню раневих післяопераційних та пов'язаних із медичними імплантатами інфекцій. Його здатність до зв'язування з фібриногеном, з одного боку, забезпечує прикріплення бактеріальної клітини до тканин організму хазяїна, а з іншого (завдяки утворенню пластівців) — захищає мікроорганізм від фагоцитів. Дані літератури свідчать про протективний ефект імунізації тварин фібриногензв'язуючим рецептором за деяких видів стафілокової інфекції [4]; перспективним виявляється і використання цього білка для діагностики інфекції [5]. Проте вплив ПлФ на організм у процесі захворювання та особливості імунної відповіді на нього потребують подальшого вивчення і будуть корисні для пошуків нових антистафілококових терапевтичних та профілактичних засобів захисту. У зв'язку з цим важливим є отримання пластівцеутворюючого фактора у достатній кількості. І, оскільки ефективних методів виділення ковалентно зв'язаного з пептидогліканом ПлФ із клітинної стінки *S. aureus* не знайдено (всі вони є трудомісткими та характеризуються низьким виходом продукту, до того ж різного складу), вдалою альтернативою є експресія

пресія рекомбінантного пластівцеутворюючого фактора у клітинах *Escherichia coli*.

Накопичення у клітинах рекомбінантних штамів-продуцентів цільових продуктів залежить від приросту біомаси, обумовленого умовами культивування, та від факторів, що впливають на експресію клонованого гена: генетичних особливостей популяції рекомбінантних клітин, стабільності плазмиди, стану системи клітин-реципієнтів.

Метою даної роботи було дослідження впливу умов культивування на вихід рекомбінантного пластівцеутворюючого фактора та підвищення його експресії у клітинах *E. coli*.

Матеріали і методи

Штами бактерій та плазмиди. В роботі використано люб'язно наданий нам проф. Т. Фостером (Trinity College, Dublin 2, Republic of Ireland) штам-продуцент рекомбінантного ПлФ, отриманий на основі реципієнта *E. coli* XLI-Blue (supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi, relA1, lac [F, proAB⁺, lac^a, lacZ Δ M15, Tn10(tet^r)]). Штам-реципієнт трансформовано сконструйованою за допомогою вектора pQE30 плазмидою pCF41, у якій під контролем сукупності промотора фага T5 та подвійного модуля lac-оператора міститься ген, що кодує фрагмент пластівцеутворюючого фактора *S. aureus* (лігандзв'язуючий домен — 221–559 залишки) [6]. Генетичним маркером плазмиди pCF41 є ген *bla* (β -лактамази), що за-

безпечує стійкість трансформованих клітин до ампіциліну.

Культивування штаму. *E. coli* вирощували на середовищах LB, 2YT та M9 із додаванням гідролізату казеїну (до 1%), дріжджового екстракту (до 0,5%) і глюкози (до 1%) при 37 °С та активній аерації до оптичної густини 0,5–0,6 (при $\lambda=600$ нм, $ОГ_{600}$). Для забезпечення селективного росту клітин, які містять плазмиду, у всі середовища додавали ампіцилін (200 мкг/мл). Для індукції синтезу рекомбінантного білка додавали ізопропілтіо- β -D-галактозид, ІПТГ «Pharmacia», Швеція до концентрації 0,5 мМ та вирощували культуру до стаціонарної фази росту. Клітини збирали центрифугуванням, суспендували у буфері (20 мМ трис-НСl, 0,5 мМ ЕДТА рН 8,0), руйнували ультразвуком і використовували у подальшій роботі. З метою одержання кривих росту штаму-продуцента через кожну годину від початку культивування вимірювали $ОГ_{600}$ на спектрофотометрі «Ultrospec 2000».

Для оцінки виживання клітин, які містять плазмиду, та динаміки росту культури визначали співвідношення між $ОГ_{600}$ суспензії та кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) в одиниці об'єму. Для цього послідовно розводили клітинну суспензію у фізіологічному розчині (10^{-1} – 10^{-7}) і висівали по 0,1 мл суспензії із кожного розведення на агаризоване поживне середовище (LB з 2% бактоагару) з додаванням антибіотика або без нього та інкубували при 32 °С. Після цього підраховували колонії, що виросли на чашках Петрі, і на основі отриманих даних порівнювали динаміку росту всіх клітин популяції, визначену за $ОГ_{600}$ та вмістом КУО, з динамікою росту ампіцилін-резистентних клітин (Ar^r). Концентрацію КУО у нерозведній суспензії визначали як сумарну кількість всіх підрахованих колоній за кожного розведення суспензії [7]. Долю Ar^r -клітин визначали поділом кількості клітин, що виросли на селективному середовищі з антибіотиком, на кількість клітин, які виросли на середовищі без антибіотика.

Виділення рекомбінантних білків із клітин *E. coli*. Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин та з тілець включення шляхом очищення їх на колонці з IDA-сефарозою-6В. Перед нанесенням на колонку білки у супернатанті осаджували сульфатом амонію і суспендували у буфері (20 мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 0,5 М NaCl, рН 7,5). Осад лізату для розчинення тілець включень суспендували в буфері (20 мМ Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 , 0,5 М NaCl, 8 М сечовина, рН 7,5). Зразки наносили на колонку з IDA-сефарозою-6В, заряджену Ni^{2+} . Для елюції білка застосовували ступінчастий градієнт імідазолу (5–300 мМ).

SDS-електрофорез у поліакриламідному гелі.

Аналіз бактеріальних білків проводили з допомогою електрофорезу в 12%-му поліакриламідному гелі [9], використовуючи як маркери бичачий сироватковий альбумін (66,2 кДа), овальбумін (42,7 кДа), інгібітор трипсину (21,5 кДа) («Sigma», США). Гелі фарбували Кумасі діамантовим голубим R-250. Вміст білків, синтезованих у клітинах, визначали скануванням електрофоретичного гелю та аналізом доріжок із допомогою комп'ютерної програми «Densitometer».

Результати та обговорення

Нами виявлено, що генно-інженерна конструкція, яка забезпечує експресію рекомбінантного пластівцевоутворюючого фактора, є недостатньо стабільною, тому перед отриманням біомаси слід попередньо проводити відбір клонів штаму з найбільш вираженою здатністю до продукції рекомбінантного білка. Для цього окремі колонії висівали на рідке середовище LB з ампіциліном, вирощували, як зазначено вище, і аналізували склад клітинних білків за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі. Відібрані високопродуктивні клони (експресія 18–20% білка) використовували у подальших дослідженнях. Як видно з рис. 1, в окремих клонах після індукції з'являються смуги, які відповідають білку з молекулярною масою біля 45 кДа, що і очікувалось для рекомбінантного ПлФ.

Нестабільність експресії не пов'язана з базальним синтезом рекомбінантного ПлФ у неіндукованих клітинах оскільки на електрофореграмі зразків культур, відібраних до індукції синтезу білка ІПТГ, відсутні смуги, які відповідають цьому білку (рис. 1). З іншого боку, в ре-

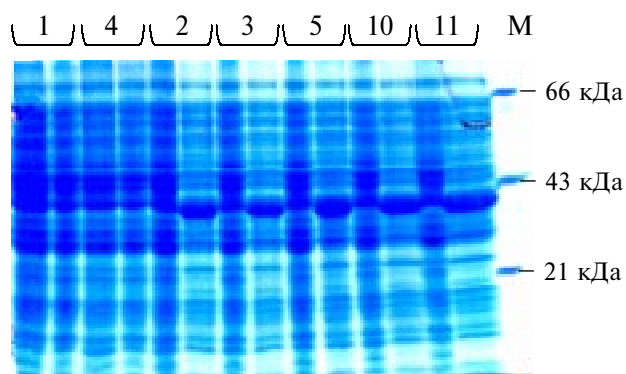


Рис. 1. Електрофоретичні профілі білків різних клонів штаму XLI-Blue *E. coli* – продуцента пластівцевоутворюючого фактора: клони 1 і 4 не продукують ПлФ, клони 2, 3, 5, 10, 11 – продуценти рекомбінантного білка (кожна перша лінія – неіндукована культура, друга – кінцева біомаса), М – маркери молекулярної маси.

зультаті дослідження вмісту антибіотикорезистентних клітин у популяції з'ясовано, що у процесі культивування відбувається швидка елімінація плазмиди із клітин, яка, як ми вважаємо, є основною причиною зниження рівня продуктивності штаму.

Стабільність експресії залежить від умов культивування, дози та кількості антибіотика, що додається в середовище. Нами визначено, що однократне додавання антибіотика в кількості 100 мкг/мл, як це прийнято, на початку ферментації недостатнє для забезпечення істотного переважання в популяції продуктивних клітин, що містять плазмиду (Ap^r). За таких умов отримано біомасу, в якій міститься незначна кількість цільового продукту. Високий рівень біосинтезу рекомбінантного пластівцеутворюючого фактора може бути досягнутий постійним селективним тиском на культуру за допомогою антибіотика за рахунок підвищення його концентрації до 200 мкг/мл та періодичного додавання такої самої його кількості у процесі культивування. Розроблено оптимальну схему внесення ампіциліну у процесі культивування (200 мкг/мл на початку та через кожні 2 години культивування, а після індукції ІПТГ — через 1 годину), у разі застосування якої зменшення накопичення безплазмідних клітин не позначається на швидкості приросту біомаси.

Далі було підібрано оптимальне середовище культивування, яке, з одного боку, дозволяло б отримувати найбільшу щільність культури у процесі вирощування, а з іншого — більш ефективний біосинтез продукту. З цієї метою нами випробовано середовища Лурія-Бертані (LB), 2YT та M9 із додаванням гідролізату казеїну до 1%, дріжджового екстракту до 0,5% і глюкози до 1% (M9+ГК+ДЕ+Гл). Вибір компонентів для останнього середовища було обумовлено тим, що транскрипція гена *clfA* знаходиться під контролем промотора фага T5 та модуля репресії — двох *lac*-операторів.

Як видно з рис. 2, найбільший вихід біомаси спостерігається за використання середовища 2YT. Проте максимальний біосинтез рекомбінантного ПЛФ має місце у разі вирощування *E. coli* на середовищі M9+ГК+ДЕ+Гл (рис. 3). При цьому вже через 3 год після індукції ІПТГ вміст білка складає 22% всіх клітинних білків і продовжує збільшуватись до 4-ї год (до 30%), тоді як на інших двох середовищах він досягає такого рівня лише через 4 год після індукції експресії (на LB — 18%, на 2YT — 23%).

Ми вибрали для нарощування біомаси середовище M9+ГК+ДЕ+Гл, оскільки за вирощування культури на ньому відбувається більш інтен-

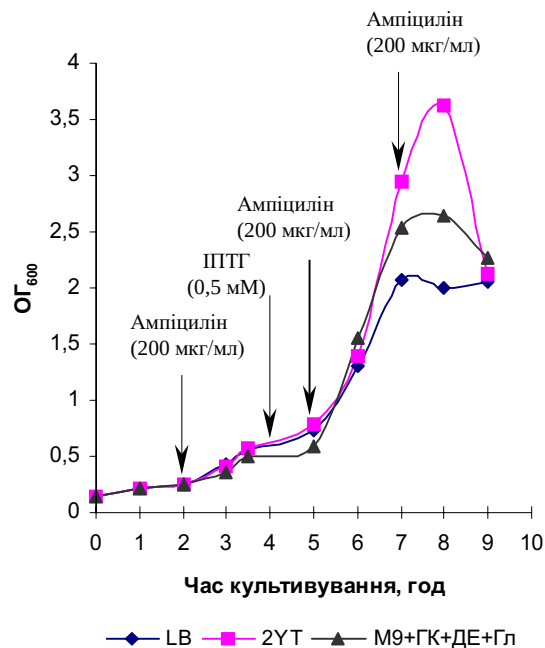


Рис. 2. Залежність росту культури *E. coli* XLI-Blue pCF41 від складу середовища. Умови культивування: об'єм культури 100 мл, температура до індукції ІПТГ 32 °С, після індукції — 37 °С, швидкість обертання шейкера — 170 об/хв.

сивне та швидке накопичення рекомбінантного білка у клітинах *E. coli* на фоні повільнішого, але достатньо активного, приросту біомаси. До того ж це середовище містить компоненти, необхідні для росту клітин, які відсутні у складі двох інших — глюкозу як джерело вуглецю та енергії та буферну сольову основу (M9), що пе-

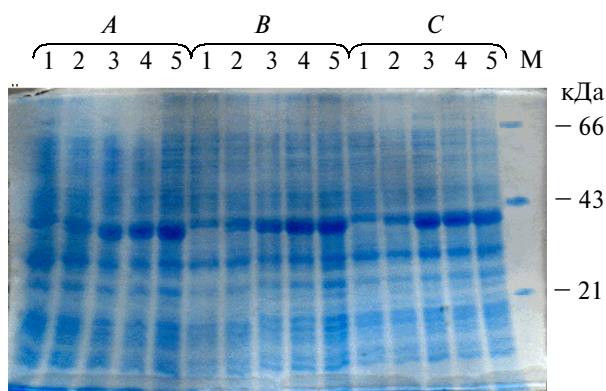


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз біосинтезу рекомбінантного пластівцеутворюючого фактора у клітинах *E. coli* XLI-Blue, які культивували на середовищах 2YT (A), LB (B) та M9+ГК+ДЕ+Гл (C). Лінії (до/після індукції 0,5 мМ ІПТГ): до індукції — 1, після індукції через 1 год — 2; через 3 год — 3, через 4 год — 4, через 5 год — 5. M — маркери молекулярної маси.

решкоджає різким змінам рН культури, а отже швидкому припиненню її росту.

За порівняння динаміки росту культури *E. coli* на середовищі М9+ГК+ДЕ+Гл, визначеної за результатами вимірювання оптичної густини культури, з результатами, отриманими за підрахунку колонієутворюючих одиниць, виявлено, що у той самий час, як згідно з $ОГ_{600}$ культура переходить у стаціонарну фазу росту (5 год після індукції), кількість КУО продовжує збільшуватись, що свідчить про активний фізіологічний стан і подальший ріст культури (рис. 4), хоча, з іншого боку, спостерігається зменшення кількості рекомбінантного білка у клітинах продуцентів (рис. 3) Отже, для отримання максимальної кількості білка достатнім виявляється культивування клітин на середовищі М9+ГК+ДЕ+Гл протягом 4 год після індукції ІПТГ.

З метою виділення та очистки рекомбінантного плазмидоутворюючого фактора досліджували його локалізацію в розчинній та нерозчинній фракціях білків клітин *E. coli*. Виявлено, що у клітинах ПлФ знаходиться в розчинній формі (22% всіх клітинних білків) і частково у вигляді тілець включення (8% всіх білків клітини) (рис. 5). Рекомбінантний білок містить додатковий фрагмент із 6 залишків гістидину на N-кінці,

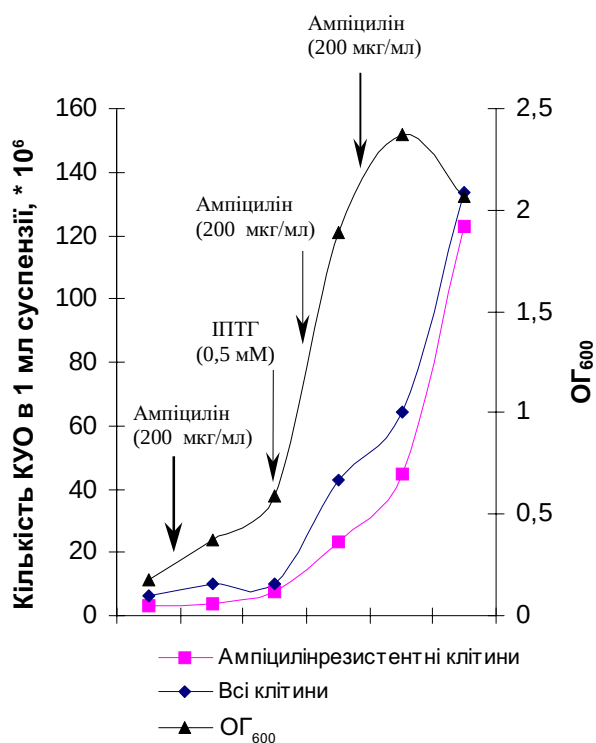


Рис. 4. Динаміка росту *E. coli* XLI-Blue – продуцента рекомбінантного ПлФ на середовищі М9+ГК+ДЕ+Гл за періодичного додавання ампіциліну (200 мкг/мл) (за $ОГ_{600}$ та кількістю КУО).

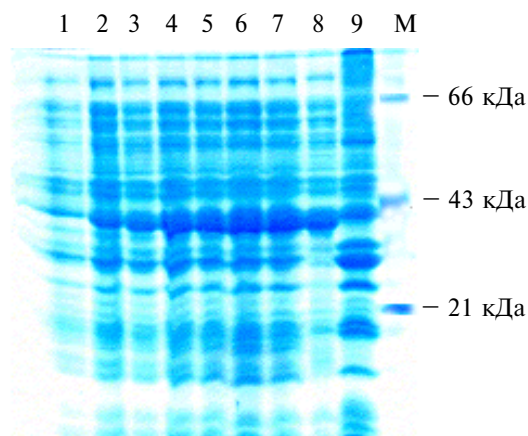


Рис. 5. Електрофоретичний аналіз експресії гена *clfA* *S. aureus* у клітинах *E. coli* XLI-Blue: сумарні клітинні білки (1), до та через: 1 год (2), 2 год (3), 3 год (4), 4 год (5), 5 год (6), 5,5 год (7) після індукції ІПТГ; супернатант лізату (8); нерозчинна фракція клітин (9); М – маркери молекулярної маси (середовище культивування – LB).

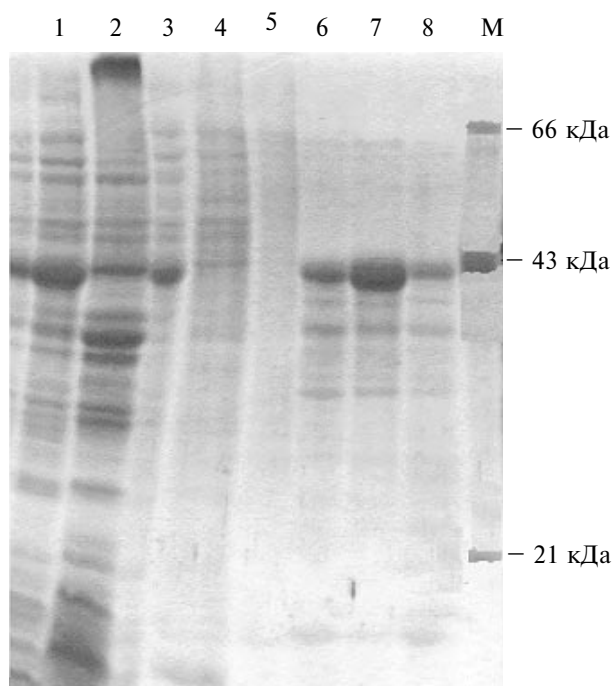


Рис. 6. Аналіз хроматографічного очищення рекомбінантного білка на колонці з IDA-Сэфарозою-6В: 1 – лізат клітин, 2 – нерозчинна фракція білків, 3 – білки розчинної фракції, 4 – білки, що не зв'язуються з колонкою, 5–8 – фракції елюату: 5 – 10 мМ імідазолу, 6 – 80 мМ, 7 – 90 мМ, 8 – 300 мМ; М – маркери молекулярної маси.

що дозволило ефективно зв'язувати його на колонці з IDA-сэфарозою-6В та очищувати з високим виходом (24 мг білка з 1 л культури). Для

елюції білка застосовували ступінчастий градієнт імідазолу (5–300 мМ). Білок виходив трьома піками при концентраціях імідазолу в буфері для елюції 80, 90, 300 мМ (рис. 6).

Отже, за допомогою описаних заходів оптимізовано процес культивування *E. coli* штаму XLI-Blue pCF41 – продуцента рекомбінантного пластівцевоутворюючого фактора *S. aureus*, внаслідок чого досягнуто високий рівень біосинтезу білка (біля 30% всіх клітинних білків) у даній експресійній системі.

Дослідження проведені на базі АТЗТ НБК “ДіаПрофМед”. Автори висловлюють щире подяку к.б.н. Піліпенку В.Г., к.б.н. Мойсі Л.М. за допомогу під час виконання роботи.

V. D. Ivanova, V. K. Pozur

THE OPTIMIZATION OF RECOMBINANT CLUMPING FACTOR OF *Staphylococcus aureus* EXPRESSION IN *Escherichia coli* XLI-BLUE

S u m m a r y

Experiments for optimization of the *clfA* gene expression in *E. coli* XLI-Blue cells were conducted. It has been shown the reducing of the strain efficiency and the elimination of the plasmid during the cultivation of a producer. Several methods for raising the amount of plasmid-containing cells and increasing the yield of recombinant protein were proposed. Bacterial growth medium was selected to make this process more efficient. In such conditions after IPTG induction of the recombinant cells we have received high level of a soluble protein (about 30%

of total cellular protein). The recombinant protein containing the His tag on N-terminus was purified on IDA-Sepharose column with high yield.

K e y w o r d s: clumping factor, *Staphylococcus aureus*, stability of the plasmid, expression.
Taras Shevchenko National University, Kyiv, Ukraine;
e-mail: victdzani@yahoo.com

1. Cheung A. L., Koomey J. M., Butler C. A. et al. // J. Clin. Invest. 1991. **87** (6). P. 3827–3831.
2. Vaudaux P. E., Francois P., Proctor R. A. et al. // Infect. Immun. 1995. **63** (2). P. 585–590.
3. Moreillon P., Entenza J. M., Francioli P. et al. // Ibid. **63**(12). P. 4738–4743.
4. Espersen F., Clemmensen I. // Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C]. 1985. Apr. 9. **3**(2). P. 53–58.
5. Colque-Navarro P., Palma M., Soderquist B., Flock J.-I. // Clin. and Diagnostic Lab. Immun. 2000. **7**, N 1. P. 14–20.
6. O'Connell D. P., Nanavaty T, McDevitt D et al. // J. Biol. Chem. 1998. Mar. 20. **273**(12). P. 6821–6829.
7. Методы лабораторных исследований по бешенству / Под ред. Kaplan M., Koprowski H. Женева: ВОЗ. 1975. 365 с.
8. Laemmli U. K. // Nature. 1970. **227**(259). P.680–685.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: victdzani@yahoo.com

Одержано 14.06.2001