

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 616.932:579.25

Конструирование и изучение свойств авирулентного генетически измененного штамма *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с инактивированными генами термолабильного гемолизина и эффективной экспрессией клонированного гена В-субъединицы холерного токсина

© 2017 г. Н.И. СМИРНОВА*, Е.Ю. ЩЕЛКАНОВА, Е.Ю. БАРАНИХИНА, Д.А. АГАФОНОВ, И.В. ТУЧКОВ, Я.М. КРАСНОВ, В.В. КУТЫРЕВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб", Саратов 410005

* e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 16.06.2016

Принята в печать 13.07.2016

Представлены результаты конструирования авирулентного штамма геноварианта *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор с эффективной продукцией В-субъединицы холерного токсина (СТ), обеспечивающей формирование антитоксического иммунитета при холере. В начале исследования на основе нетоксигенного штамма геноварианта P18899ΔСТХφHly⁺ путем ненаправленного транспозонного мутагенеза был получен модифицированный штамм P18899ΔСТХφchr::TnpHoA (Km^RHly⁻), утративший способность продуцировать термолабильный гемолизин, который относится к дополнительным токсинам. Далее в клетки этого штамма был введен ген *ctxB*, кодирующий биосинтез В-субъединицы СТ. С этой целью была использована коинтегративная рекомбинантная плазмида pIEM3, образованная за счет объединения конъюгативной плазмиды pIEM1 и неконъюгативной pСТА27, производной pBR322, несущей клонированный ген *ctxB*. С помощью рестрикционного анализа установлено, что в клетках холерного вибриона произошло разделение коинтеграта с последующим сохранением лишь многокопийной плазмиды pСТА27. В результате были получены авирулентные клоны Km^RTc^R с высоким уровнем продукции секретируемой В-субъединицы СТ (5–6 мкг/мл), один из которых (E99) был взят для дальнейших исследований. Методом ПЦР-РВ было обнаружено, что экспрессия плазмидного гена *ctxB* в клетках сконструированного штамма *V. cholerae* E99 не зависит от активности ключевого регуляторного гена *toxT*, расположенного на хромосоме. Эффективная экспрессия гена *ctxB* в клетках E99 позволяет использовать его для получения В-субъединицы СТ с целью изготовления холерных иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* O1, геновариант, секвенирование, гемолизин, рекомбинантная плазмида, В-субъединица холерного токсина, транскрипция.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-30-41

Холера, особо опасная инфекционная болезнь, широко распространена во многих странах Азии, Африки и Южной Америки. Текущая седьмая пандемия холеры (с 1961 г. по настоящее время) вызвана возбудителем *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Локальные вспышки и единичные случаи холеры в России связаны с ее завозом из стран, неблагополучных по этой инфекции [1–3].

Развитие инфекционного процесса при холере обеспечивается действием в тонком кишечнике человека двух основных факторов вирулент-

ности – токсин-корегулируемых пилей (ТСП) и холерного токсина (СТ), состоящего из двух субъединиц – А и В. За счет ТСП, локализованных на поверхности бактериальной клетки, холерные вибрионы колонизируют тонкий кишечник. СТ, продуцируемый размножившимися вибрионами, вызывает развитие основного клинического симптома холеры – профузной диареи.

Биосинтез ТСП и СТ кодируют соответственно гены *tcpA-F* и *ctxAB*, расположенные в двух мобильных элементах – острове патогенности 1 (или VPI-1) и профаге СТХφ [4–6].

Список сокращений: АТС – антитоксическая сыворотка; пн – пар нуклеотидов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени; РПИГ – реакция пассивного иммунного гемолиза; среда LB – среда Luria–Berthani; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; СТ (Cholera Toxin) – холерный токсин; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); ТСП (Toxin-Coregulated Pilus) – токсин-корегулируемые пили.

Токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, обусловившие последнюю пандемию холеры, относятся к двум разным группам – типичным штаммам, вызвавшим начало пандемии, и их генетическим вариантам (геновариантам), которые впервые появились в 1991 г. и вызывают эпидемии холеры в настоящее время [7–9]. Основное различие между типичными штаммами и их генетическими вариантами состоит в разной нуклеотидной последовательности гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу СТ [8, 9]. У типичных штаммов в нуклеотидной последовательности гена *ctxB* в позиции 115 и 203 присутствует тимин (Т), тогда как у геновариантов – цитозин (С). Замена тимина на цитозин (Т/С) в указанных позициях приводит соответственно к замене тирозина на гистидин в 39-м положении белковой молекулы и треонина на лейцин в 68-м положении. Функциональная значимость этих замен состоит в модификации иммуногенных свойств В-субъединицы.

Наряду с измененным геном В-субъединицы геноварианты, изолированные от больных в последние 15 лет, несут еще одну несинонимическую нуклеотидную замену в гене *tcpA*, кодирующем основную субъединицу ТСП, которые определяют формирование антиколонирующего иммунитета при холере: в положении 266 аденин заменен на гуанин (А/Г). Такая модификация последовательности ДНК приводит к замене аспарагина на серин в 89-м положении белковой молекулы и, как следствие, к изменению иммуногенных свойств ТСП [10]. Проведенный молекулярно-генетический анализ клинических штаммов, выделенных на территории России, показал их принадлежность к природным геновариантам *V. cholerae* биовара Эль Тор с измененной нуклеотидной последовательностью не только гена *ctxB*, но и *tcpA*. Такая ситуация указывает на необходимость совершенствования средств иммунопрофилактики холеры. При инфицировании возбудителем холеры у зараженных формируется иммунитет, образование которого стимулируют различные протективные антигены, среди которых основными являются соматический O1-антиген, В-субъединица СТ и ТСП, вызывающие образование антибактериальных, антитоксических и антиколонирующих антител, соответственно [11, 12].

Появление и широкое распространение геновариантов возбудителя холеры Эль Тор указывает на необходимость конструирования на их основе штаммов-продуцентов ключевых протективных антигенов, применяемых для из-

готовления современных холерных иммунодиагностических и профилактических препаратов. Более того, для обеспечения биологической безопасности при производстве указанных препаратов весьма важна авирулентность созданных штаммов с высокой продукцией иммуногенных белков.

В настоящее время с помощью молекулярно-биологических методов уже создан ряд авирулентных штаммов *E. coli* и *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, являющихся продуцентами В-субъединицы СТ – ключевого протективного антигена холерного вибриона, обеспечивающего формирование антитоксического иммунитета [13–16]. Однако до сих пор отсутствуют авирулентные геноварианты серогруппы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с высоким уровнем биосинтеза В-субъединицы, которые могли бы использоваться не только в качестве продуцента этого белка, но и для создания холерных профилактических препаратов.

Цель настоящего исследования состояла в инактивации у авирулентного штамма геноварианта *V. cholerae* биовара Эль Тор одного из генов *hly*, определяющих биосинтез термолabileмного гемолизина, путем внедрения транспозона *TnpHoA* и конструирования на его основе штамма, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовали бактериальные штаммы *Escherichia coli* SM10 (λ -*pir*(+)/pRT733(*oriR6L*, *Tra*(–), *Mob*(+), Ap^RKm^R) и *E. coli* KS164 *thy polA*/pIEM3(Km^RTc^R), полученные из Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (Москва), а также *V. cholerae* неO1/неO139 KM93 $\text{ctxB}^+\text{Tc}^R\text{Hly}^-$, *V. cholerae* P18899 Δ СТХφTox[–]Hly⁺Str^R и *V. cholerae* O1 классического биовара 569В $\text{ctxA}^+\text{B}^+\text{Tox}^+\text{Hly}^-$, хранящиеся в коллекции «ГКПБ-Микроб».

Штаммы бактерий культивировали на твердой или жидкой питательной среде LB (Sigma, США) при 37°C с добавлением при необходимости тетрациклина (2 мкг/мл для штаммов *V. cholerae* или 12 мкг/мл для штаммов *E. coli*), ампициллина (100 мкг/мл), канамицина (50 мкг/мл) или стрептомицина (100 мкг/мл) (ОАО «Биосинтез», Россия).

Перенос транспозона TnphoA из плазмиды pRT733 в хромосому *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox-Hly⁺Str^R

Для внедрения транспозона TnphoA (Km^R) в хромосому *V. cholerae* с целью получения клонов с нарушенным биосинтезом термолабильного гемолизина использовали суицидный вектор pRT733, содержащий ген устойчивости к ампициллину (*bla*) и несущий транспозон TnphoA (Km^R), который является производным транспозона Tn5. Векторная плазида pRT733 способна реплицироваться в клетках *E. coli* только в присутствии гена *pir*, но из-за отсутствия этого гена в геноме холерных вибрионов ее репликация в этих клетках невозможна [17, 18]. Для переноса плазмиды из *E. coli* SM10(TnphoA)Ap^RKm^R в клетки *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox-Hly⁺Str^R использовали метод конъюгации на твердой среде [19]. Селективной средой служил агар LB (Sigma-Aldrich, США) с добавлением канамицина и стрептомицина. Выросшие колонии проверяли на наличие маркеров резистентности плазмиды (Ap^R) и транспозона (Km^R), помещая их методом реплик на твердые питательные среды с соответствующими антибиотиками. Утрата клонами плазмидного маркера при сохранении устойчивости к канамицину, определяемой транспозоном, свидетельствовала о транспозиции TnphoA из плазмидного генома в хромосому.

Поскольку Tn-элемент может с определенной частотой внедряться в сайты бактериального генома *V. cholerae*, находящиеся в генах, кодирующих и контролирующих биосинтез термолабильного гемолизина, у всех клонов Km^RAp^S с внедренным в хромосому транспозоном определяли продукцию этого белка.

Определение гемолитической активности

Для оценки гемолитической активности штаммов *V. cholerae* использовали LB-агар с добавлением 3% свежих отмытых бараньих эритроцитов (НПО “Биоконт”, Россия), помещая на него исследуемые клоны методом реплик.

Перенос конъюгативной рекомбинантной плазмиды с клонированным геном *ctxB* из донорного штамма *E. coli* в клетки *V. cholerae*

Рекомбинантную плазмиду pEM3(Km^RTc^R), несущую клонированный ген *ctxB*, переносили из клеток штамма *E. coli* KS164 *thy polA/pEM3* в

клетки нетоксигенного штамма *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox-Hly⁻Km^RStr^R с помощью межродовых конъюгационных скрещиваний на твердой среде. В качестве селективной среды использовали минимальный агар с добавлением тетрациклина. Частоту передачи селектируемого маркера определяли как соотношение количества транс-конъюгантов к количеству клеток донора в конъюгационной смеси. Выросшие колонии проверяли на наличие у них неселектируемых маркеров донора.

Оценка продукции В-субъединицы СТ клетками холерного вибриона

Определение продукции В-субъединицы проводили качественным и количественным методами. Качественным методом служила РПИГ на твердой среде [20, 21]. Для ее осуществления изолированные колонии изучаемых штаммов методом реплик переносили на чашки с 1% отмытых в синказном бульоне эритроцитов барана (НПО “Биоконт”). Посевы инкубировали 18 ч при 30°C, заливали слоем 0,5%-ного синказного агара, содержащего азид натрия (Sigma-Aldrich), компонент морской свинки (“Микроген”, Россия) и монорецепторную антитоксическую сыворотку (АТС) (Sigma-Aldrich) и помещали в термостат (37°C) на 1–2 ч. По истечении указанного времени вокруг макроколоний, продуцирующих и секретирующих в культуральную среду В-субъединицу, формировалась зона иммунного гемолиза.

Для количественной оценки продукции В-субъединицы СТ использовали иммуноферментный метод GM₁-ELISA [22]. Изучаемые штаммы культивировали при 37°C в жидкой среде АК1 (pH 7,6), содержащей 0,5% NaCl, 0,3% NaHCO₃, 0,4% дрожжевого экстракта и 1,5% бактопептона (Difco, США) [23]. Полученный с помощью центрифугирования культуральный супернатант двукратно титровали и добавляли в количестве 100 мкл в лунки микропланшетов (Greiner, США) предварительно сенсibilизированных моносиалганглиозидом GM₁ (Sigma, США). После этого неспецифическую сорбцию блокировали инертным белком (бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich)) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C.

Инкубацию с АТС проводили в течение 60 мин при 37°C. После промывания лунок 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,2) (Amresco) добавляли иммуноферментный конъюгат (диагностические антитела против IgG (H+L) кролика, меченные пероксидазой (“Медгамал”, Россия)) в рабочих разведениях. Результаты реакции регистрировали через 30 мин

после добавления субстрата (0,003%-ного раствора перекиси водорода (“ХимПэк”, Россия) в цитратном буфере (Sigma-Aldrich), pH 4,0, с 0,1% ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоуксидом) (Sigma-Aldrich) путем измерения оптической плотности на фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 405 нм. В качестве контроля использовали очищенный препарат В-субъединицы СТ (Sigma-Aldrich) в концентрации 100 нг/мл, а также физиологический раствор (НПП “ПанЭко”, Россия). В соответствии с установленной чувствительностью метода рассчитывали количество В-субъединицы СТ, продуцируемой исследуемыми штаммами.

Выделение ДНК

Выделение и очистку геномной ДНК проводили из бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора Аху Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Ахуген, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки предварительно обрабатывали мертиолятом натрия (Sigma-Aldrich) до конечной концентрации

1:10000 (0,01%) и прогревали при 56°C в течение 30 мин. Выделение плазмидной ДНК, рестрикцию и электрофорез проводили, как описано в [24].

Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили, как описано ранее [25]. Реакционная смесь содержала 10-кратный ПЦР-буфер (pH 8,4), 25 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, олигонуклеотидные праймеры – по 10 пмоль и *Taq*-ДНК-полимеразу – 0,1 ед. (все компоненты производства “Синтол”, Россия). Ампликоны разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле (1,5–2%) в однократном буфере трис/борат/ЭДТА (производитель компонентов Thermoscientific, США). Продукты окрашивали бромидом этидия (Amresco), визуализовали в УФ-свете и фотографировали с помощью гель-документирующей системы VersaDoc (BioRad, США), используя программу Quantity One v. 4.6.9 (BioRad). Маркерами молекулярной массы служили компоненты коммерческого набора GenRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Литва). Использованные праймеры приведены в таблице.

Праймеры и зонды, использованные в работе

Primers and probes used in this work

Праймер, зонд	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	Источник
ctxB-1 ctxB-2	ATGATTAATTAATAATTTGG TTAATTTGCCATACTAATTG	[26]
Tn5(Kan)-S Tn5(Kan)-As	ATTCGGCTATGACTGGGCA ATGTTTCGCTTGGTGGTGG	[27]
tcpA-1 tcpA-2	CTTTGTGTGGTTAAATGTGCG AATAATCCGACACCTTGTGG	Расчет авторов
recA-RT1 recA-RT2 recA-зонд	ACGGGTAACCTCAAGCAATC TATCCAAACGAACAGAAGCG (FAM)CCACTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1)	То же
ctxB-RT1 ctxB-RT2 ctxB-зонд	GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACA CGACTTTAGCTTCAGTAAGATATGC (ROX)AGCGATTGAAAGGATGAAGGATACCCTG-(BHQ2)	»»»
tcpA-RT1 tcpA-RT2 tcpA-зонд	CGCTGAGACCACCCATA GAAGAAGTTTGTAAAAGAAGAACACG (FAM)AGAAAACCGGTCAAGAGGGT-(BHQ1)	[28]
toxT-RT1 toxT-RT2 toxT-зонд	TGATGATCTTGATGCTATGG GACTGATATGCAATCTGTT (FAM)GCGTAATTGGCGTTGGGCAGAT-(BHQ1)	Расчет авторов

Секвенирование ДНК

Секвенирование геномной ДНК проводили на приборе 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems, США), как описано в [29]. Полученные последовательности анализировали с использованием программы Mega 5.0 и выравнивали с соответствующим участком последовательностей-прототипов референс-штаммов *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор и *V. cholerae* O395 классического биовара, депонированных в базе данных GenBank.

Определение уровня транскрипции генов, кодирующих и контролирурующих биосинтез В-субъединицы СТ и ТСР, в клетках штаммов холерного вибриона

На первом этапе из биомассы изучаемых штаммов, полученной при выращивании культур в LB-бульоне (37°C с аэрацией, 5 ч), выделяли тотальную РНК с помощью набора реактивов SV total RNA isolation system (Promega, США). Концентрацию и степень очистки полученных препаратов РНК определяли на спектрофотометре Biowave DNA (Biochrom Ltd, Англия), согласно инструкции производителя. Получение кДНК на матрице суммарной мРНК проводили с использованием набора реагентов “Реверта” (ООО “Интерлабсервис”, Россия). Для оценки относительного количества мРНК генов *ctxA*, *ctxB*, *tcpA* и *toxT* в клетках исследуемых штаммов использовали метод обратной транскрипции с последующим проведением ПЦР-РВ.

Определение транскрипции генов проводили с использованием прибора Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen Inc, ГМВН, Германия) с праймерами и TaqMan-зондами (“Синтол”, Россия), представленными в таблице. В качестве положительного стандарта использовали разведения плазмидной ДНК (от 10^7 до 10^3 нг/мл) с клонированным участком исследуемого гена. Нормирование полученных данных проводили относительно конститутивно экспрессирующегося гена *resA* методом $2^{-\Delta\Delta CT}$ [30]. Для оценки уровня транскрипции каждого гена ПЦР одновременно проводили в двух повторностях с тремя независимо полученными образцами кДНК. Для статистической обработки данных применяли программу Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внедрение транспозона TnpHoA в хромосому нетоксигенного штамма *V. cholerae* P18899 Δ CTX ϕ Tox⁻Hly⁺Str^R и отбор клонов с утраченной продукцией гемолизина

Для конструирования штамма, синтезирующего В-субъединицу СТ, был выбран нетоксигенный штамм *V. cholerae* P18899 Δ CTX ϕ Tox⁻Hly⁺Str^R полученный нами ранее из токсигенного штамма *V. cholerae* P18899 Δ CTX ϕ Tox⁺Hly⁺Str^R биовара Эль Тор в результате спонтанной утраты генома профага СТХ ϕ , который содержал структурные гены *ctxAB*, кодирующие СТ [31]. Исходный штамм P18899 был выделен у больного холерой в 2006 г. в России. Секвенирование полного генома этого штамма и анализ полученных данных показали принадлежность его к природным геновариантам, у которых в нуклеотидной последовательности гена *ctxB* (375 пн) в позициях 115 и 203 тимин (Т) заменен на цитозин (С), что характерно для холерных вибрионов классического биовара (рис. 1, а). Более того, у P18899 была изменена нуклеотидная последовательность гена *tcpA* (597 пн), кодирующего основной белок токсин-регулируемых пилей, которые относятся к протективным антигенам, обеспечивающим формирование антиколонизирующего иммунитета при холере. В 89-м кодоне в позиции 266 аденин был заменен на гуанин (А/Г), что привело к изменению аминокислотной последовательности белка ТсрА (рис. 1, б). Спонтанная утрата этим штаммом структурных генов *ctxAB*, кодирующих СТ, обусловила возможность его использования для последующего получения на его основе продуцента В-субъединицы СТ.

Вместе с тем, выбранный штамм продуцировал и секретировал в среду выращивания термолабильный гемолизин, что затрудняло изучение большого числа клонов, несущих клонированный ген *ctxB*, по продукции В-субъединицы СТ простым методом РПИГ на твердой среде. Более того, в случае дальнейшего использования P18899 Δ CTX ϕ Tox⁻Hly⁺Str^R в качестве живого вакцинного штамма могли возникнуть побочные реакции, обусловленные продукцией гемолизина, который оказывает цитодеструктивное действие на клетки и вследствие этого относится к цитолизинам [32]. Эти обстоятельства определили необходимость инактивации либо структурных (*hlyA*, *hlyB*),

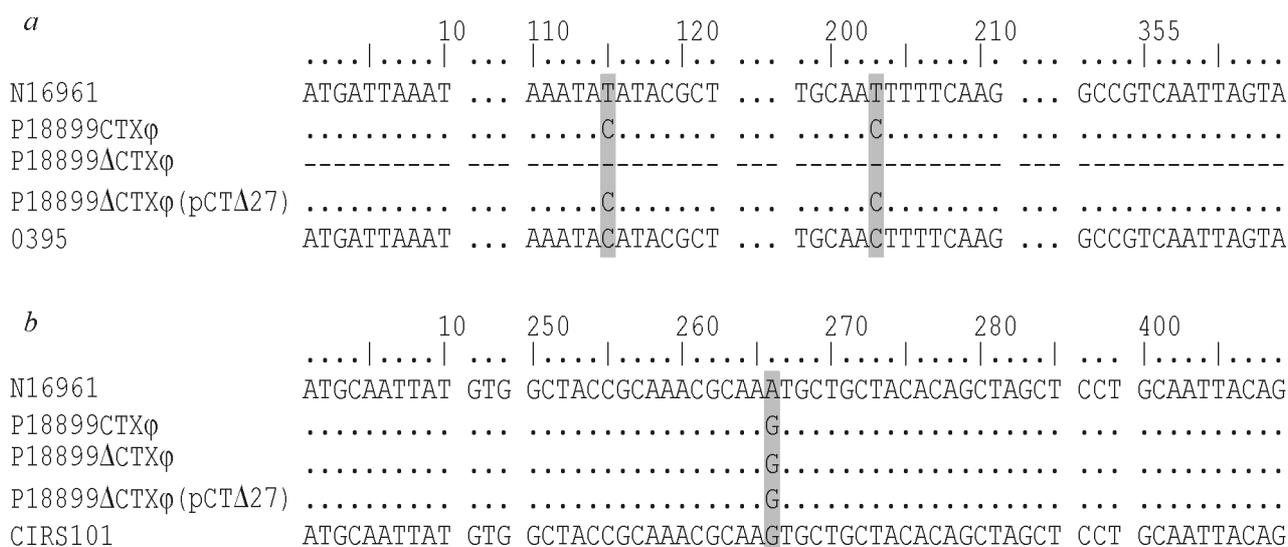


Рис. 1. Фрагменты нуклеотидных последовательностей генов *ctxB* (*a*) и *tcpA* (*b*) следующих штаммов *V. cholerae*: P18899CTXφ – клинический токсигенный штамм биовара Эль Тор; P18899ΔCTXφ – спонтанный мутант P18899CTXφ, утративший профаг CTXφ; P18899ΔCTXφ(pCTΔ27) – производный P18899ΔCTXφ, несущий рекомбинантную плазмиду pCTΔ27 с клонированным геном *ctxB*; N16961 и O395 – референс-штаммы *V. cholerae* соответственно Эль Тор и классического биоваров, нуклеотидные последовательности генов *ctxB* (N16961 и O395) и *tcpA* (N16961) которых взяты из GenBank; CIRS101 – генетический вариант возбудителя холеры биовара Эль Тор, нуклеотидная последовательность гена *tcpA* которого представлена в GenBank. Идентичные нуклеотиды обозначены точками. Отсутствие нуклеотидов указано пунктиром. Серым цветом выделены однонуклеотидные замены в положении 115 и 203 (*ctxB*) и 266 (*tcpA*)

Fig. 1. Fragments of nucleotide sequences of the *ctxB* (*a*) and *tcpA* (*b*) genes of the following *V. cholerae* strains: P18899CTXφ, a clinical toxigenic strain of El Tor biovar; P18899ΔCTXφ, a spontaneous mutant of P18899CTXφ that has lost the CTXφ prophage; P18899ΔCTXφ(pCTΔ27), a derivative of P18899ΔCTXφ bearing the recombinant plasmid pCTΔ27 with the cloned *ctxB* gene; N16961 and O395, reference strains of *V. cholerae* El Tor and classical biovar, respectively, whose nucleotide sequences for *ctxB* (N16961 and O395) and *tcpA* (N16961) were taken from GenBank; and CIRS101, a genetic variant of the cholera cause of El Tor biovar whose gene *tcpA* nucleotide sequence is represented in GenBank. Identical nucleotides are indicated by dots. Broken line designates lacking nucleotides. Mononucleotide substitutes in positions 115 and 203 (*ctxB*), and 266 (*tcpA*) are typed gray

либо регуляторных (*hlyU*) хромосомных генов, определяющих биосинтез гемолизина, в клетках штамма *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁺Str^R.

Для указанной инактивации был использован мутагенез с помощью транспозона TnphoA(Km^R), способного беспорядочно внедряться в различные участки бактериального генома [17]. Вектором для введения транспозона в клетки холерного вибриона служила суицидная плаزمидка pRT733 (Ap^RKm^R), содержащая помимо TnphoA(Km^R) ген устойчивости к ампициллину. Введение плазмиды в клетки *V. cholerae* осуществляли путем скрещивания донорного штамма *E. coli* SM10 pRT733 (Ap^RKm^R) с реципиентом *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁺Str^R. Селективной средой служил LB с добавлением стрептомицина и канамицина; селектируемым классом были Km^R-клоны. Частота конъюгационного переноса плазмиды pRT733 составляла 4,0·10⁻⁶. В результате было отобрано 1200 Km^RAp^S-клонов P18899ΔCTXφ, утративших плазмидный репликон с маркером

Ap^R, но сохранивших резистентность к канамицину, обусловленную транспозоном, внедренным в бактериальный геном.

Поскольку TnphoA способен встраиваться во многие сайты бактериальной хромосомы, включая гены, участвующие в продукции гемолизина, у всех полученных транспозантов была проверена способность к продукции этого белка. В результате среди 1200 клонов *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnphoATox⁻Km^R, несущих транспозон в хромосоме, было обнаружено три Km^R-мутанта, не продуцирующих термолабильный гемолизин. Внедрение Tn-элемента в хромосому *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnphoATox⁻Km^R было подтверждено ПЦР с применением специфического праймера для центральной части TnphoA, определяющей резистентность к канамицину (см. рис. 2, *a*, дорожки 3, 4). Таким образом, с помощью транспозонного мутагенеза были выделены клоны *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnphoATox⁻Km^R, не продуцирующие термолабильный гемолизин вследствие

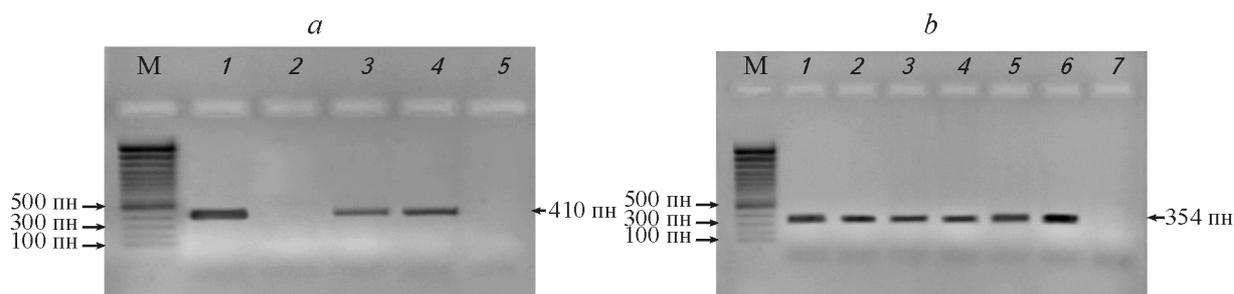


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР со специфическими праймерами для выявления транспозона TnpHoA (a) и гена *ctxB* (b) в геноме изучаемых штаммов. М – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use); a: 1 – донорный штамм *E. coli* SM10 pRT773 (TnpHoA); 2 – реципиентный штамм *V. cholerae* P18899ΔCTXφ биовара Эль Тор; 3, 4 – транспозанты *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA; 5 – вода (отрицательный контроль). b: 1–5 – трансконъюганты *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA (pСТА27), несущие клонированный ген *ctxB*; 6 – *E. coli* KS164 (pIEM3) – донорный штамм, несущий клонированный ген *ctxB*; 7 – *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA – реципиентный штамм

Fig. 2. Electrophoresis of PCR products with specific primers for the detection of TnpHoA transposon (a) and gene *ctxB* (b) in the genomes of the studied strains. M, markers of molecular masses (Thermo Scientific MassRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use); (a): (1), a donor *E. coli* SM10 pRT773 (TnpHoA) strain; (2), a recipient *V. cholerae* P18899ΔCTXφ strain of El Tor biovar; (3) and (4), transposants of *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA; (5), water (a negative control). (b), (1)–(5), *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA (pСТА27) transconjugants bearing the *ctxB* cloned gene; (6), *E. coli* KS164 (pIEM3), a donor strain bearing the *ctxB* cloned gene; and (7), *V. cholerae* P18899ΔCTXφchr::TnpHoA, a recipient strain

внедрения TnpHoA в хромосомный сайт, связанный с продукцией этого белка. Фенотип этих клонов был обозначен как P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁻Km^R. Один из них был взят для дальнейших исследований.

Введение в клетки нетоксигенного и гемолизиннегативного штамма *V. cholerae* рекомбинантной плазмиды с клонированным геном *ctxB*, кодирующим В-субъединицу СТ, и оценка уровня продукции этого белка

Для конструирования штамма, продуцирующего В-субъединицу СТ, на основе полученного штамма P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁻Km^R была использована рекомбинантная коинтеграционная конъюгативная плаزمида pIEM3, образованная за счет объединения двух плазмид – конъюгативной pIEM1 и неконъюгативной pСТА27. Конъюгативная pIEM1 маркирована резистентностью к канамицину (Km^R). Неконъюгативная pСТА27, имеющая ген тетрациклиноустойчивости (*tetC*), являющийся ее селективным маркером (Tc^R), содержит клонированный *Pst*I-фрагмент профага СТХφ (5,4 ппн) токсигенного штамма *V. cholerae* RV79 биовара Эль Тор. Кроме того, pСТА27 несет частично делетированный ген *ctxA* (размер делеции 257 ппн), определяющий продукцию А-субъединицы СТ, а также интактный ген *ctxB*, кодирующий биосинтез В-субъединицы СТ [13].

В клетки отобранного штамма P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁻Km^R методом конъюгации вводили плазмиду pIEM3(Km^RTc^R). Донором служил штамм *E. coli* KS164 *thy polA* (pIEM3). В качестве селективной среды использовали LB-агар с добавлением тетрациклина и стрептомицина. Частота конъюгационного переноса плазмиды pIEM3 из клеток *E. coli* KS164 *thy polA* (pIEM3) в клетки *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox⁻Hly⁻Km^R составляла $5,0 \cdot 10^{-7}$. Трансконъюганты (проверено 30 клонов) были резистентны к тетрациклину и канамицину, что указывает на присутствие в их клетках плазмиды pIEM3. При ПЦР-анализе ряда Km^RTc^R-клонов было установлено, что они действительно содержали в плазмидном репликоне ген *ctxB* (см. рис. 2, b, дорожки 1–5). Наличие нуклеотидных замен в этом гене (тимина на цитозин в позициях 115 и 203), характерных для холерных вибрионов классического биовара, было подтверждено секвенированием (см. рис. 1, a).

Поскольку pIEM3 состоит из двух плазмид, существовала вероятность того, что в клетках холерного вибриона могло произойти разъединение коинтеграта с последующим сохранением лишь многокопийной плазмиды pСТА27, содержащей гены *tetC* и *ctxB*. Для проверки предположения о сохранении в клетках лишь неконъюгативной pСТА27-части плазмиды pIEM3 мы провели рестрикционный анализ плазмидной ДНК в одном произвольно выбранном Km^RTc^R-клоне *V. cholerae* с использованием эндонуклеаз рестрикции *Pst*I и *Xho*I.

Первая из них имеет три сайта узнавания в плазмиде рЕМЗ, два из которых находятся в пределах рСТА27-части коинтеграта. При обработке плазмидной ДНК Тс^RКм^R-клона *V. cholerae* эндонуклеазой *Pst*I было установлено, что изучаемая плаزمида содержит лишь два сайта для этой эндонуклеазы и поэтому образует два фрагмента размером 4,3 и 5,4 тпн (рис. 3, дорожка 1), Суммарная величина указанных фрагментов полностью совпадает с размером плазмиды рСТА27 (9,7 тпн). Это означает, что в клетках исследованных штаммов *V. cholerae* фенотипа Км^RТс^R действительно скорее всего произошло разъединение коинтеграта с сохранением в них лишь его неконъюгативной рСТА27-части.

Единственный сайт узнавания для эндонуклеазы *Xho*I присутствует только в плазмиде рЕМ1. Результаты проведенного рестрикционного анализа плазмидной ДНК Км^RТс^R-клона с использованием этой эндонуклеазы также свидетельствуют об отсутствии рЕМ1 и сохранении лишь интактной рСТА27-части плазмиды рЕМЗ (см. рис. 3, дорожка 2).

Для оценки стабильности наследования этой плазмиды в клетках трансконъюгантов два произвольно взятых клона *V. cholerae* P18899ΔСТХφchr::TnpA(pСТА27) выращивали в LB-бульоне без антибиотиков в течение 18 ч и далее высевали на LB-агар для получения изолированных колоний, которые проверяли на резистентность к канамицину и тетрациклину. Оказалось, что в клетках *V. cholerae* в отсутствие селективного давления плазмиды сохраняется в 95% случаев (проверено 500 клонов), При оценке биосинтеза В-субъединицы методом РПИГ установлено, что все проверенные

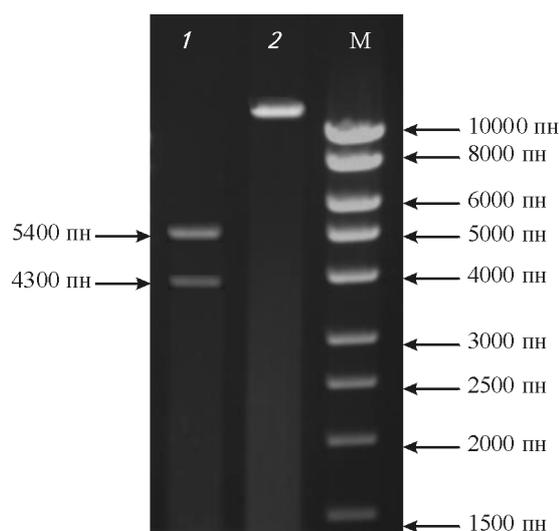


Рис. 3. Электрофоретическое разделение фрагментов плазмидной ДНК *V. cholerae* P18899ΔСТХφchr::TnpA(pСТА27) в 1,0%-ном агарозном геле после обработки эндонуклеазами *Pst*I (1) и *Xho*I (2); М – маркеры молекулярной массы (Thermo Scientific MassRuler High Range DNA Ladder, ready-to-use)

Fig. 3. Electrophoresis of *V. cholerae* P18899ΔСТХφchr::TnpA(pСТА27) plasmid DNA fragments in 1.0% agarose gel after the treatment with the following nucleases: (1), *Pst*I; and (2), *Xho*I. M, markers of molecular masses (Thermo Scientific MassRuler High Range DNA Ladder, ready-to-use)

Км^RТс^R-клоны продуцировали этот секретируемый белок (рис. 4, колонии 9–24), При этом уровень его продукции был примерно такой же, как у высокотоксигенного штамма *V. cholerae* 569В, взятого в качестве положительного контроля (см. рис. 4, колонии 1–8).

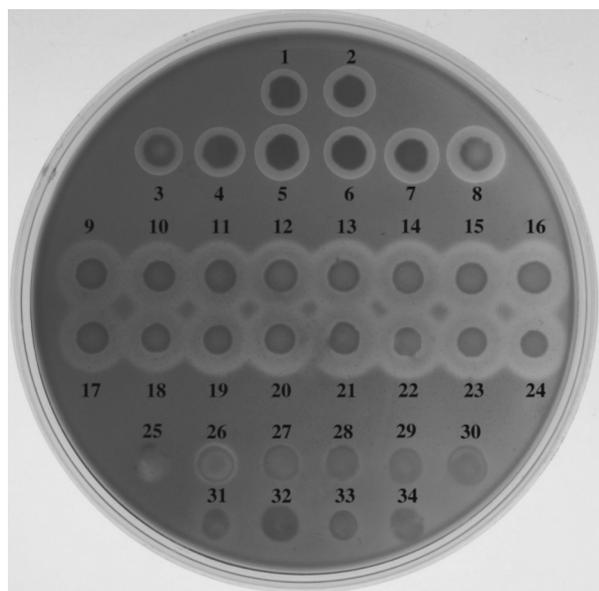


Рис. 4. Продукция В-субъединицы холерного токсина полученными трансконъюгантами и контрольными штаммами *V. cholerae* по данным РПИГ: 1–8 – штаммом 569В, классический биовар (положительный контроль); 9–24 – полученными трансконъюгантами P18899ΔСТХφchr::TnpA(pСТА27) биовара Эль Тор; 25–34 – реципиентным штаммом P18899ΔСТХφchr::TnpA

Fig. 4. B-subunit CT production by the obtained transconjugants and control strains of *V. cholerae* according to RPIH: (1)–(8), *V. cholerae* 569В strain of classical biovar (a positive control); 9–24, the obtained P18899ΔСТХφchr::TnpA(pСТА27) transconjugants of El Tor biovar; (25)–(34), a recipient P18899ΔСТХφchr::TnpA strain

Количественная оценка биосинтеза В-субъединицы СТ с помощью ELISA позволила установить, что $Tc^R Km^R$ -клоны продуцировали 5–6 мкг/мл этого секретируемого белка. Для дальнейшей работы был выбран один из клонов с наиболее высокой продукцией В-субъединицы СТ, который мы обозначили как *V. cholerae* E99.

Таким образом, на основе авирулентного геноварианта P18899ΔСТХφТох⁻Нly⁻Кm^R получен штамм *V. cholerae* E99 O1-серогруппы биовара Эль Тор, содержащий клонированный ген *ctxB* и эффективно продуцирующий В-субъединицу СТ.

Изучение генетического контроля экспрессии введенного гена *ctxB* в клетках сконструированного авирулентного штамма, продуцирующего В-субъединицу СТ

Известно, что у типичных токсигенных штаммов холерного вибриона активность генов *ctxAB*, входящих в состав фага СТХφ, интегрированного с хромосомой, контролируется расположенными в разных участках хромосомы регуляторными генами *toxR/S*, *tcpP/H*, *aphA/B* и *toxT* через регуляторный каскад. При этом центральная роль в активации транскрипции генов *ctxAB* принадлежит гену *toxT*, поскольку именно белок ТохТ непосредственно индуцирует транскрипцию генов СТ, а также генов *tcpA-F*, кодирующих ТСП [33].

Однако ситуация меняется, если фаг присутствует в клетке в репликативной форме (т.е. в виде плазмиды): в этом случае экспрессия генов *ctxAB* не зависит от активности генов *toxR-toxT* [34]. Для подтверждения данного феномена мы оценили уровень транскрипции введенного в клетки штамма *V. cholerae* плазмидного гена *ctxB*, который размещен на рекомбинантной плазмиде рСТА27, и резидентного центрального регуляторного гена *toxT*, локализованного на хромосоме. С этой целью был использован метод обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. В качестве контроля служил исходный токсигенный штамм *V. cholerae* P18899 СТХφ, у которого также определяли уровень транскрипции хромосомных генов *ctxB* и *toxT*. В результате было установлено, что уровень транскрипции гена *ctxB* в сконструированном штамме E99 был в 16,7 раз выше, чем у исходного токсигенного штамма P18899СТХφ (рис. 5). Однако транскрипционная активность регуляторного гена *toxT* у штамма E99 была значительно снижена (в 4,5 раз) в сравнении с таковой исходного токсигенного штамма P18899СТХφ (см. рис. 5).

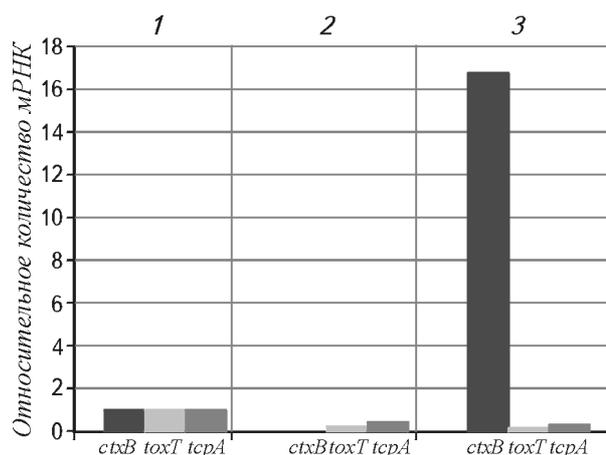


Рис. 5. Относительный уровень транскрипции генов *ctxB*, *toxT* и *tcpA* у изученных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор: 1 – P18899СТХφ, клинический токсигенный штамм, содержащий в профаге гены *ctxAB*; 2 – P18899ΔСТХφchr::TnpHoA, нетоксигенный штамм, производный от P18899СТХφ, спонтанно утративший профаг СТХφ с генами *ctxAB* и несущий транспозон TnpHoA в хромосоме; 3 – E99, сконструированный штамм – продуцент В-субъединицы холерного токсина, несущий клонированный ген *ctxB* в составе рекомбинантной плазмиды рСТА27, производный от штамма P18899ΔСТХφchr::TnpHoA

Fig. 5. Relative level of *ctxB* (a), *toxT* (b) and *tcpA* (c) genes transcription in the investigated *V. cholerae* biovar El Tor strains: (1), P18899СТХφ, a clinical toxigenic strain containing *ctxAB* genes in the prophage; (2), P18899ΔСТХφchr::TnpHoA, a nontoxigenic strain derived from P18899СТХφ with the spontaneously lost CTXφ prophage containing the *ctxAB* genes, and bearing the TnpHoA transposon in the chromosome; and (3), E99, a constructed strain producing В-subunit of the cholera toxin, bearing the *ctxB* cloned gene in the рСТА27 recombinant plasmid and derived from the P18899ΔСТХφchr::TnpHoA strain

Отсутствие эффективной транскрипции указанного регуляторного гена при наличии весьма высокой активности гена *ctxB* можно рассматривать как свидетельство того, что экспрессия гена *ctxB*, находящегося в составе рекомбинантной плазмиды, является *toxT*-независимой и у природных геновариантов. Таким образом, эти данные, подтверждая ранее полученные результаты, говорят о том, что при внехромосомной локализации гена *ctxB* независимо от плазмиды-носителя (репликативная форма собственного профага СТХφ или чужеродная для холерного вибриона рекомбинантная плазмиды с клонированным геном *ctxB*) его экспрессия происходит без вмешательства известных регуляторных белков и в клетках природных геновариантов возбудителя.

Созданный штамм E99, помимо измененного гена *ctxB*, характерного для холерных вибрионов классического биовара, несет в хромосоме

модифицированный ген *tcpA*, присущий недавно выделенным природным геновариантам возбудителя и участвующий в биосинтезе ТСР. Оба указанных гена определяют формирование антиколонирующего иммунитета при холере; в связи с этим для нас представляло интерес изучение экспрессии гена *tcpA* в клетках штамма Е99.

Оказалось, что транскрипционная активность гена *tcpA* у штамма Е99 была снижена в 4 раза по сравнению с исходным токсигенным штаммом Р18899 СТХφ (см. рис. 5, 3), Вполне возможно, что такая ситуация обусловлена низким уровнем у штамма Е99 транскрипции гена *toxT*, белковый продукт которого является позитивным регулятором активности не только структурных генов *ctxAB*, но и *tcpA-F*.

В заключение следует отметить, что в результате проведенных молекулярно-генетических экспериментов нами на основе авирулентного геноварианта *V. cholerae* Р18899ΔСТХφТох⁻Нly⁺ О1-серогруппы биовара Эль Тор путем ненаправленного транспозонного мутагенеза был получен модифицированный штамм, утративший способность к биосинтезу термолabileного гемолизина, который относится к дополнительным токсинам. Последующее введение в клетки созданного штамма Р18899ΔСТХφТох⁻Нly⁺ Km^R коинтегративной рекомбинантной плазмиды рЕМЗ, несущей в рСТА27-части клонированный ген *ctxB*, позволило получить авирулентный штамм со стабильной продукцией ключевого протективного антигена возбудителя холеры – В-субъединицы СТ, способной стимулировать локальный иммунный ответ. Эффективная экспрессия гена *ctxB* в клетках сконструированного штамма Е99 позволяет использовать его для получения В-субъединицы СТ с целью изготовления холерных иммунобиологических препаратов. Кроме того, сконструированный продукт принадлежит к геновариантам возбудителя холеры *V. cholerae* О1-серогруппы биовара Эль Тор, которые в последние десятилетия встречаются повсеместно в эндемичных по холере регионах и почти ежегодно заносятся на территорию России. Это является важным преимуществом полученного штамма перед ранее созданными продуцентами В-субъединицы на основе *E. coli* и *V. cholerae* неО1/неО139-серогрупп, также несущими ген *ctxB* в составе рекомбинантной плазмиды. Данное обстоятельство позволит использовать сконструированный штамм Е99 и для одновременного получения двух протективных антигенов – О1-антигена и В-субъединицы СТ – при изготовлении холерных химических вакцин нового поколения для обеспечения защиты против современных штаммов возбудителя с измененным геномом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., et al. Cholera at the Beginning of the XXI Century: Prognosis. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* (J. Microbiol., Epidemiol. Immunobiol.), 2005, (3), 44–48.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., and Kutryev V.V. Variability of Genomes of *Vibrio cholerae* biovar El Tor Modified Variants Currently Isolated at the Territory of Russia. *Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* (Mol. Genetics, Microbiol. Virol.), 2011, (3), 11–18.
3. Kaper J.B., Morris J.G., and Levin M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, 8, 48–89.
4. Cotter P.A., and DiRita V.J. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, 54, 519–565.
5. Davis B.M., and Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr. Opinion Microbiol.*, 2003, 6, 35–42.
6. Hartley D.M., Morris J.G., and Smith D.L. Hyperinfectivity: a critical element in the ability of *V. cholerae* to cause epidemics – *PLoS Med*, 2006, 3(1), e7.
7. Faruque S.M., Tam V.C., Chowdhury N., et al. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Nair. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2007, 104(12), 5151–5156.
8. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(11), 4211–4213.
9. Smirnova N.I., Goriayev A.A., and Kutryev V.V. Evolution of Cholera Cause Genome in the Modern Period. *Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* (Mol. Genetics, Microbiol. Virol.), 2010, (4), 11–19.
10. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, 49(11), 3739–3749.
11. Svennerholm A.M., and Holmgren J. Synergistic protective effect in rabbits of immunization with *Vibrio cholerae* O1 lipopolysaccharide and toxin/toxoid. *Infect. Immun.*, 1976, 13, 735–740.
12. Sun D., Mekalanos J.J., and Tailor R.K. Antibodies directed against the toxin-coregulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. *J. Infect. Dis.*, 1990, 161, 1231–1236.
13. Yanishevskii N.V., Gintsburg A.L., Vertiev Yu.V., et al., Construction of Recombinant Plasmids Encoding the Biosynthesis of B-Subunit of Cholera Toxin. *Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* (Mol. Genetics, Microbiol. Virol.), 1987, (4), 26–32.
14. Carlin, N., and Lebens M. Expression system for the B Subunit of cholera toxin. Patent Application Publication US20070212757 A1, 2007.

15. Smirnova N.I., Krepostnova I.M., Livanova L.F., et al. A *Vibrio cholerae* avirulent strain, producer of B-subunit of cholera toxin: Obtaining and molecular genetic analysis. *Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* (Mol. Genetics, Microbiol. Virol.), 2007, (4), 7–13.
16. Smirnova N.I., Kobkova I.M., Livanova L.F., et al., Expression of homologous and heterologous genes for protective antigens in *Escherichia coli* M17. *Biotekhnologiya* (Biotechnology) – 2006, (4), 13–22.
17. Das D.K. and Nester E.W. TnpA and its use in transposon mutagenesis. *Adv. Microbiol.*, 2014, 4, 15–19.
18. Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., and Mekalanos J.J. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1987, 84(9), 2833–2837.
19. Bradley D.E., Taylor D.E., and Cohen D.R. Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1980, 143(3), 1466–1470.
20. Bramucci M.G., and Holmes R.K. Radial passive immune hemolysis assay for detection of heat-labile enterotoxin produced by individual colonies of *Escherichia coli* or *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, 8(2), 252–255.
21. Shaginyan I.A., and Marakusha V.I., Modification of Passive Immune Hemolysis Method on Dense Medium for Detection of Thermolabile Enterotoxins Production by *Vibrio cholerae* and *E. coli* Strains. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* (J. Microbiol., Epidemiol. Immunobiol.), – 1983(2), 92–96.
22. Svennerholm A.M., and Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, 1983, 17(4), 596–600.
23. Iwanaga M., and Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, 22(3), 405–408.
24. Maniatis T. Fritsch E., and Sambrook J. Methods in genetic engineering. Molecular cloning. M.: Mir (Translated into Russian), 1984.
25. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Shchelkanova E.Yu., et al., Genovariants of cholera cause El Tor: Obtaining, molecular genetic and proteomic analyses. *Molekuliarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya* (Mol. Genetics, Microbiol. Virol.), 2014, (1), 21–31.
26. Siddique A.K., Zaman K., Akram K., et al. Emergence of a new epidemic strain of *Vibrio cholerae* in Bangladesh. An epidemiological study. *Trop. Geogr. Med.*, 1994, 46(3), 147–150.
27. Nikiforov K.A., Anisimova L.V., Odinokov G.N., et al., Construction of a primer set for the detection of genes for antibiotic resistance in causes of dangerous bacterial infections using strains of *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy* (Problems in Especially Dangerous Infections), 2014, (3), 57–60.
28. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., et al., Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(5), 1457–1466.
29. Sanger F., Nicklen S., and Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, 74(12), 5463–5467.
30. Livak K.J., and Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*, 2001, 25(4), 402–408.
31. Smirnova N. I., Kul'shan' T. A., Baranikhina E. Yu., et al. Genome Structure and Origin of Nontoxigenic Strains of *Vibrio cholerae* of El Tor Biovar with Different Epidemiological Significance. *Genetika* (Russ. J. Genet.), 2016, 52(9), 914–925.
32. Ikigai H., Akatsuka A., Tsujiyama H., Nakae T., et al. Mechanism of membrane damage by El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae* O1. *Infect. Immun.*, 1996, 64(8), 2968–2973.
33. Matson J.S., Withey J.H., and DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.*, 2007, 75(12), 5542–5549.
34. Faruque S.M., Rahman M.M., Hasan A.K.M., et al. Diminished diarrheal response to *Vibrio cholerae* strains carrying the replicative form of the CTXF genome instead of CTXF lysogenes in adult rabbits. *Infect. Immun.*, 2001, 69(10), 6084–6090.

Construction and Investigation of Properties of Avirulent Genetically Altered Strain of *Vibrio cholerae* biovar El Tor with Inactivated Genes for Heat-Sensitive Hemolysine and Effective Expression of Cloned Cholera Toxin B-subunit Gene

N.I. SMIRNOVA*, E.Yu. SCHELKANOVA, E.Yu. BARANIKHINA, D.A. AGAFONOV, I.V. TUCHKOV, Ya.M. KRASNOV, and V.V. KUTYREV

The Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, 410005 Russia

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

Received June 16, 2016

Accepted July 13, 2016

Abstract – The results of engineering of avirulent *V. cholerae* genovariant strain of O1 serogroup, biovar El Tor, with the effective production of the cholera toxin B-subunit (CT) which provides the development of the antitoxic immunity to cholera are represented.

First, on the basis of the non-toxicogenic genovariant strain P18899 Δ CTX ϕ Hly⁺, a modified strain P18899 Δ CTX ϕ chr::TnphoA(Km^RHly⁻) was obtained by the non-directed transposon mutagenesis. The latter lost its ability to produce heat-sensitive hemolysine that falls under the category of additional toxins. To introduce the cloned *ctxB* gene encoding CT B-subunit biosynthesis in the cells of the strain, a co-integrate recombinant plasmid pIEM3(Tc^R) derived from pBR322 was selected. It was established using the restriction analysis that the dissociation of the co-integrate with the only subsequent retention of a high-copy pCT Δ 27 plasmid occurred in the vibrio cells. As a result, avirulent Km^RTc^R clones with high levels of secreted CT B-subunit production (5–6 mg/mL) were obtained, and one of them (E99) was selected for the further studies. Using RT-PCR, it was found out that the expression of the plasmid-located *ctxB* gene in the engineered E99 strain cells is independent of the chromosomal key regulatory *toxT* gene activity. The effective *ctxB* gene expression in the cells of E99 permits to use it in the CT B-subunit production for manufacturing anti-cholera immunobiological preparations.

Key words: *Vibrio cholerae* O1, genovariant, sequencing, hemolysine, recombinant plasmid, cholera toxin B-subunit, transcription.

doi: 10.1016/0234-2758-2017-33-1-30-41