

КЛОНИРОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА OMP1 CHLAMYDIA TRACHOMATIS В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI

О.А. Белозорова

ГУ «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины»

Резюме. В статье рассмотрены проблемы проведения клонирования гена *omp1 Chlamydia trachomatis* в клетках *Escherichia coli* и возможности использования полученного конструктора для получения генноинженерных вакцин. Приведены результаты клонирования двух фрагментов гена *omp1*.

Ключевые слова: клонирование, ген *omp1 Chlamydia trachomatis*, плазмидная ДНК, секвенирование.

ВВЕДЕНИЕ

Инфекции, вызванные *Chlamydia trachomatis* относятся к наиболее распространенным инфекциям человека. К ним относятся: мочеполовой хламидиоз, паховая лимфогранулема, болезнь Рейтера, трахома и др [1]. Ежегодно во всем мире фиксируются 90 миллионов новых случаев заражения, при этом 75% случаев мочеполового хламидиоза протекают бессимптомно.

Одним из основных интегральных мембранных белков *C. trachomatis* является главный белок наружной мембраны или МОМР (Major Outer Membrane Protein). Данный белок занимает более 60% поверхности клетки и относится к группе поринов – порообразующих белков, непосредственно реализующих многие аспекты динамической связи между бактериями и окружающей средой. Он во многом определяет структурную интеграцию внеклеточного инфекционного элементарного тельца в клетку-хозяина и преобразование элементарного тельца во внутриклеточное ретикулярное, обеспечивающее дальнейшее развитие возбудителя [7].

МОМР *C. trachomatis* является высокоиммуногенным. Антитела к МОМР нейтрализуют инфицируемость элементарными тельцами, что свидетельствует о протективных свойствах данного белка, который не только вызывает выработку специфических антител, но и активирует Т-лимфоциты, включая CD4+ и CD8+ Т-клетки, усиливает секрецию ФНО-γ [6]. МОМР содержит целый ряд эпитопов, характеризующихся родо-, видо- и серовароспецифичностью [2], он состоит из пяти константных и четырех переменных

доменов [3]. Последние отличаются по своей первичной структуре у различных серотипов хламидий и играют важную роль в формировании специфического иммунитета.

Учитывая высокую иммуногенность МОМР большой интерес представляет использование его для диагностики, а также, возможно, для иммунопрофилактики и иммунотерапии хламидиозов. Вместе с этим, получение очищенного протеина МОМР стандартными методами из биомассы возбудителя является достаточно трудной задачей. Культивирование *C. trachomatis* – облигатного внутриклеточного паразита – является сложным дорогостоящим процессом, кроме того МОМР формирует пространственные дисульфидные связи с другими белками хламидийной клетки, что затрудняет его очистку. В связи с этим представляется перспективным использовать для получения препарата МОМР современных молекулярно-биологических методов, т. е. клонировать, а затем и экспрессировать МОМР в клетках *Escherichia coli*.

Учитывая ряд особенностей структуры и физико-химических свойств МОМР представляется целесообразным получить не весь МОМР, а его отдельные фрагменты. МОМР кодируется геном *omp1* размером около 1100 п. н. Экспрессия гена такого размера не всегда проходит достаточно просто. Кроме того, МОМР как мембранный белок характеризуется гидрофобностью и в чистом виде образует трудно растворимые агрегаты, что затрудняет его использование.

В связи с этим задачей настоящего исследования явилось клонирование фрагментов гена

omp1 *C. trachomatis* в клетках *E. coli* с целью последующего получения достаточного количества очищенного белка МОМР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для клонирования гена *omp1* культуры *C. trachomatis* был использован штамм Вu 432 возбудителя паховой лимфогранулемы, серовар L2, из коллекции филиала Национального музея патогенных для человека культур микроорганизмов при ГУ «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины».

Выделение ДНК из культуры *C. trachomatis* проводили гуанидиновым методом [8].

Аmplицировали два фрагмента МОМР, первый из которых состоял из четвертого, а второй – третьего и четвертого вариабельных доменов.

Для проведения ПЦР использовали Taq-полимеразу и трифосфаты фирмы Fermentas, (Литва), Pfu-полимеразу и буфер для ПЦР фирмы Сибэнзим (Россия).

С целью получения фрагмента длиной 241 п.н. (четвертый домен) использовали праймеры 5'-tcg gatccggagtgtaaatggtctcgagc-3' и 5'-atgcaagcttactgtaact gcgtattgtctg-3'.

Для получения фрагмента длиной 567 н. п. (третий и четвертый домены) использовали праймеры 5' tcggatcctctttccaatacgctcaatc 3' и 5'-caactgcagacaaaattatacaattaa ttagaagcgg 3'.

Аmplификацию проводили на амплификаторе Терцик («ДНК технология», Россия). Режимы амплификации были одинаковыми для двух фрагментов: денатурация 96°C 20 секунд, отжиг 57°C 15 секунд, синтез 75°C 40 секунд, всего 35 циклов.

Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% геле агарозы, содержащем 0,001% бромида этидиума с последующим визуальным контролем образованных фрагментов на трансиллюминаторе («Биоком», Россия) при длине возбуждающего света 310 нм. Очистку ампликона от Taq-полимеразы и трифосфатов проводили с помощью протеиназы К [8].

Полученные ампликоны обрабатывали для получения липких концов в случае фрагмента из одного домена рестриктазами BamHI и Hind III, а в случае фрагмента из двух доменов – BamHI и PstI (Fermentas, Литва). Для клонирования использовался вектор pQE-80L (Qiagen), несущий ген устойчивости к ампициллину, также обработанный BamHI и Hind III (либо BamHI и PstI для соответствующего фрагмента). Лигирование

ампликонов и плазмидной ДНК проводили по стандартной методике для липких концов [8].

Полученными конструктами трансформировали бактерий штамма *E. coli* XL1-Blue. Компетентные клетки получали с использованием хлористого кальция [7]. Скрининг полученных клонов проводили путем посева одиночных колоний после трансформации на среду LB с последующей инкубацией в течение ночи при 37°C, после чего отбирали из каждой пробы 1.5 мл, выделяли ДНК методом щелочного лизиса [8] и использовали полученный материал для постановки ПЦР на фрагмент гена *omp1* для выявления клеток, несущих данную вставку.

Для подтверждения наличия вставки было также проведено секвенирование генноинженерных конструктов на секвенаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 фирмы Applied Biosystems с использованием соответствующих праймеров. Результат секвенирования анализировали программой «Chromas Lite».

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящем исследовании было проведено клонирование двух фрагментов гена *omp1*, первый из которых включал два последних домена VS3 и VS4, а второй – только четвертый домен VS4.

Результаты проведения отдельных этапов клонирования иллюстрируются электрофореграммами на рисунках 1 и 2.

На рисунке 1 приведена электрофореграмма продуктов лигирования плазмидного вектора pQE-80L и фрагмента гена *omp1*, составляющего 385 пар нуклеотидов в сравнении с интактным вектором pQE-80L. Молекулярная масса вектора

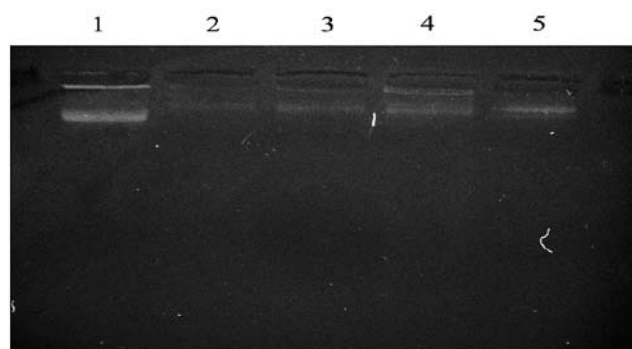


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов лигирования плазмидного вектора pQE-80L и фрагмента гена *omp1* *C. trachomatis*. 1 – вектор pQE-80L не несущий вставки; 2-5 продукты лигирования вектора pQE-80L и фрагмента гена *omp1* *C. trachomatis* (различная концентрация ДНК в образцах 2-5)

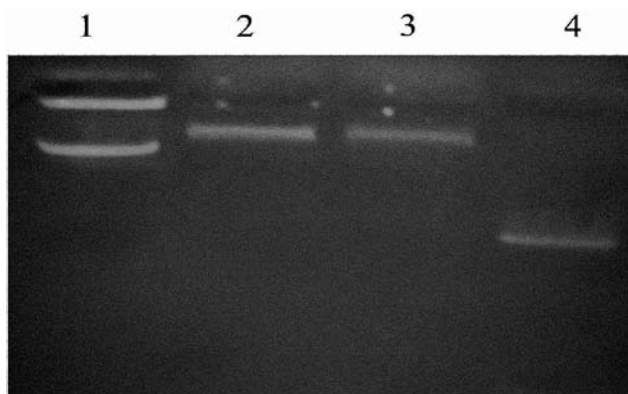


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов клонирования. Трек 1 – вектор pQE-80L; треки 2,3 – вектор pQE-80L, содержащий фрагмент гена *omp1*; трек 4 – ампликон гена *omp1*

pQE-80L составляет 4.7 кб, а молекулярная масса лигированного вектора с ДНК-вставкой – 5.085 кб соответственно. Можно отметить, что вектор со вставкой характеризуется значительной меньшей электрофоретической подвижностью в сравнении с исходным.

Для дополнительного подтверждения факта клонирования нами был проведен горизонтальный электрофорез в 1.5% геле агарозы для сравнения молекулярных масс полученных генноинженерных конструкций с массой линейного вектора. Результаты электрофореза приведены на рисунке 2.

Также было проведено секвенирование двух клонов (фрагмент гена *omp1* 2 домена и фрагмент гена *omp1* 1 домен).

Фрагмент полученной секвенограммы конструктора, содержащего один домен гена *omp1* *Chlamydia trachomatis*, приведен на рис. 3.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нам удалось клонировать два фрагмента гена *omp1* *C. trachomatis*, первый из которых содержал четвертый домен гена, а второй – третий и четвертый домены соответствующего гена. В значительной степени успех клонирования зависел от качества и степени очистки плазмидной ДНК. Удалось показать, что оптимальный выход плазмидной ДНК достигается при средней степени аэрации культуры. При высокой степени аэрации рост массы бактериальных клеток значительно превосходит скорость формирования плазмид, что приводит к уменьшению относительного количества плазмидной ДНК и большей степени ее загрязнения.

При выделении плазмидной ДНК с помощью метода щелочного лизиса в ряде случаев получали препарат плазмиды, плохо расщепляющийся рестриктазами. Мы предполагаем, что данные серии препарата плазмиды были частично денатурированы слишком длительным действием щелочи.

Важным моментом является также часто наблюдаемое загрязнение образцов выделяемой плазмиды РНК и геномной ДНК, которые могут нарушать процесс связывания ампликонов с плазмидной ДНК по сайтам рестрикции. Удалось

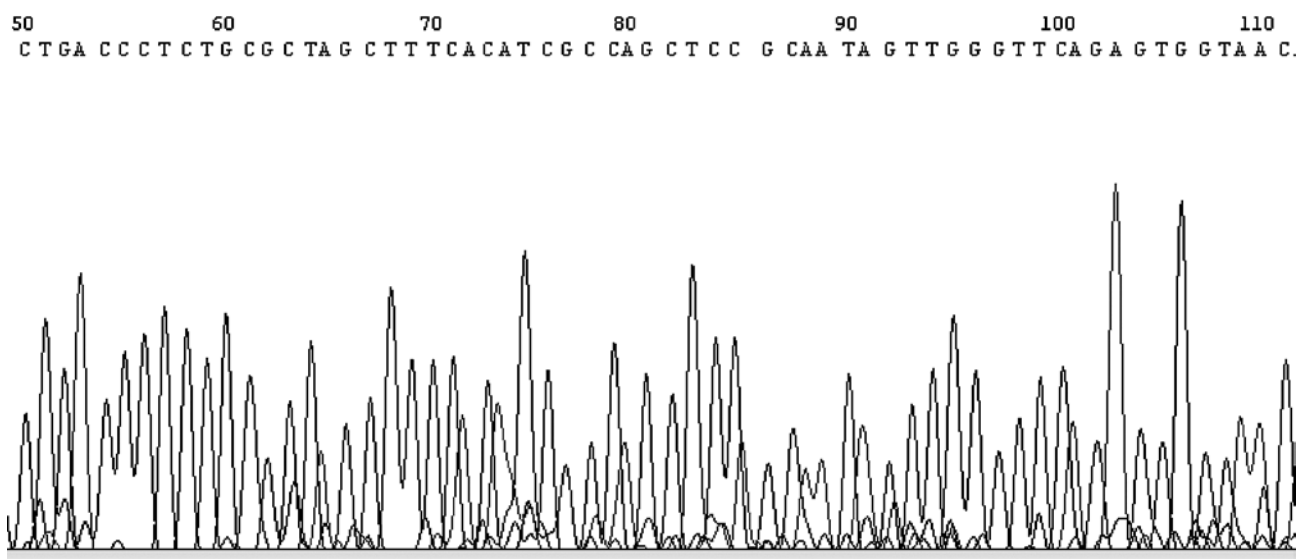


Рис. 3. Фрагмент электрофореграммы, полученной при секвенировании вектора pQE-80L, содержащего один домен гена *omp1* *Chlamydia trachomatis*

значительно снизить уровень загрязнения плазмидной ДНК тщательным соблюдением температурного режима при выделении препарата, а также добавлением в литическую смесь РНКазы на конечных этапах процесса выделения.

Среди методов контроля клонирования наиболее важным можно считать секвенирование. Именно этот метод позволяет исключить часто наблюдаемое при клонировании образование артефактных структур и комплексов встраиваемых ампликонов, а также возможные нарушения структуры плазмиды. К сожалению, даже ампли-

фикация клонируемого фрагмента с помощью специфических праймеров не позволяет выявить образование таких артефактных структур.

Полученные нами клоны планируется использовать для получения рекомбинантных фрагментов главного белка наружной мембраны хламидий. Данный белок во многом определяет специфичность иммунного ответа против данного возбудителя и может найти применение при определении специфических антител к антигенам *Chlamydia trachomatis*, а также, возможно, иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. – К., 2005. – 524 с.
2. Batteiger, B.E., Newhall, W.J., Terho, V.P., Wilde, C.E., Jones, R.B. Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with murine monoclonal antibodies. // Infection and Immunity. – 1986. – Vol. 53. – P. 530-533.
3. Choi TY, Kim DA, Seo YH. Evaluation of serotyping using monoclonal antibodies and RFLP for *Chlamydia trachomatis* serotype identification // Journal of Korean Medical Sciences. – 2001. – Vol. 16, N 1. – P. 15-19.
4. Justrand M., Falk L., Fredlund H. et al. Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 Genotypes among Sexually Transmitted Disease Patients in Sweden // J.Clin.Microbiol. 2001. – Vol. 39, N 11. – P. 3915-3919.
5. Falk L, Lindberg N, Jurstrand M, Backman, Olcen P, Fredlund H. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* would improve contact tracing // Sexually Transmitted Infections. – 2003. – Vol. 30, N 3. P. 205-210.
6. Findlay H.E., McClafferty H., Ashley R.H. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein // BMC Microbiology. – 2005. – Vol. 5, N 5.
7. Ravi Kaul, Matthew J.J. Duncan, James Guest, Wanda M. Wenman. Expression of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein-encoding gene in *Escherichia coli*: role of the 3' end in mRNA stability // Gene. – 1990. – Vol. 87. – P. 97-103.
8. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning: a laboratory manual, the third edition.- Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. – 2222 p.

КЛОНУВАННЯ ФРАГМЕНТІВ ГЕНУ OMP1 CHLAMYDIA TRACHOMATIS В КЛІТИНАХ ESCHERICHIA COLI

О.О. Білосорова

Резюме. У статті розглянуто проблеми проведення клонування гену *omp1 Chlamydia trachomatis* у клітинах *Escherichia coli* і можливості використання отриманого конструкта для отримання генноінженерних вакцин. Наведено результати клонування клонування двох фрагментів гену *omp1*.

Ключові слова: клонування, ген *omp1 Chlamydia trachomatis*, плазмидна ДНК, секвенування.

MOLECULAR CLONING OF OMP1 GENE OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS IN ESCHERICHIA COLI CELLS

О.О. Bilozorova

Resume. The article deals with the information concerns different problems of molecular cloning of *omp1* gene of *Chlamydia trachomatis* in *Escherichia coli* cells and opportunity of using it for obtaining of vaccines. Results of molecular cloning of two different parts of *omp1* gene were given.

Keywords: molecular cloning, *omp1* gene of *Chlamydia trachomatis*, plasmid DNA, sequencing.