

УДК 636.32/38:577.21:575.117.2:57.063.8

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2022.4.49-60

**НА ПУТИ К РАЗРАБОТКЕ БИОИНЖЕНЕРНЫХ МЕТОДОВ ПОВЫШЕНИЯ
МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ЖИВОТНЫХ: ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ШТАММА – ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО МИОСТАТИНА**

Колоскова Е.М., Езерский В.А., Жукова О.Б.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания – филиал ФИЦ животноводства –
ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск Калужской области, Российская Федерация*

Одно из проявлений физиологического действия миостатина (МСТ) у животных заключается в торможении гиперплазии зародышевых мышечных волокон в период внутриутробного развития (МВ). В постнатальный период применение агонистов МСТ активизирует деление сателлитных клеток, увеличивает количество ядер МВ и их толщину. Известно несколько вариантов блокирования действия МСТ, один из них – вакцинация животных с целью образования специфических антител к эндогенному миостатину, блокирования его действия и стимуляции роста скелетных мышц. Целью данной работы было получение бактериального штамма – продуцента рекомбинантного миостатина (рМСТ), использование которого в качестве антигена может стимулировать синтез специфических антител к эндогенному МСТ. Нуклеотидная последовательность зрелого МСТ овцы, оптимизированная для эффективной экспрессии рекомбинантного белка в штамме *E. coli* BL21(DE3), была интегрирована в плазмиду-вектор рЕТ-28a(+). Были подобраны условия культивирования полученного штамма-продуцента и проверена эффективность индукции синтеза рекомбинантного белка (РБ). Полученный штамм *E. coli* BL21/рЕТ28-MSTN экспрессирует РБ массой около 16 кДа, что соответствует теоретическому значению. Ранняя индукция на стадии роста культуры при низкой оптической плотности давала высокую долю рМСТ в общем бактериальном белке, но низкую наработку бактериальной биомассы. При индукции на более поздних стадиях (0,5-0,7 о.е.) относительная доля рМСТ снижалась. Полученные результаты предполагается использовать для разработки иммунобиотехнологического способа повышения мясной продуктивности животных с применением рМСТ.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, миостатин, бактериальный штамм, экспрессия гена

Проблемы биологии продуктивных животных. 2022. 4:49-60

Введение

Используемые обозначения: а.о. – аминокислотный остаток; ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактозид; ИФА – иммуноферментный анализ; МСТ – миостатин; о.е. – оптическая единица; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; РБ – рекомбинантный белок; рМСТ (rMSTN) – рекомбинантный миостатин; ActRIIB – активиновый рецептор 2B (activin type II receptor B); GDF – фактор роста и дифференцировки (growth and differentiation factor); LB – среда для роста культур бактерий – лизогенная среда (lysogeny broth); MSTN – ген (нуклеотидная последовательность) МСТ; TGF – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor).

Повышение производительности мясного скотоводства и улучшение качества мяса – одно из приоритетных направлений развития животноводства. Современные молекулярно-генетические технологии позволяют выявлять связи между фенотипическими признаками продуктивности и маркерами экспрессии целевых генов (Bongiorni et al., 2016). Дипептид миостатин (МСТ), относится к многочисленному семейству цитокинов, играющих важную роль в качестве малых сигнальных молекул в системах регуляции экспрессии генов, в процессах пролиферации и роста клеток в разных тканях (в том числе в мышечной, жировой и костной). Один из специфических эффектов МСТ, реализующийся в пренатальный период, заключается в ограничении гиперплазии мышечных волокон (МВ); поэтому у животных с нокаутированным или мутированным геном MSTN, неспособным к экспрессии полноценного белка МСТ, количество МВ в скелетных мышцах и общая масса мышц существенно увеличены. В постнатальный период применение агонистов МСТ

активизирует деление сателлитных клеток, увеличивает количество ядер на единицу длины МВ и толщину МВ.

Помимо участия в процессах формообразования скелетных мышц (McPherron, Lee, 1997a; Chen et al., 2021), МСТ оказывает влияние на функциональную активность других тканей. Блокирование действия МСТ или снижение уровня его экспрессии ведёт к снижению пролиферации адипоцитов и к уменьшению количества жировой ткани, при этом повышается плотность костей (Jackson et al., 2012; Chen et al., 2017). Аминокислотные последовательности и молекулярная структура МСТ человека, обезьяны, мыши, крысы, коровы, овцы, курицы, индейки, рыбы имеют высокий уровень гомологии. Блокирование пути от гена МСТ к его продукту и далее к клеткам-мишеням, имеющим соответствующий трансмембранный рецептор, оказывает выраженный положительный эффект на тканевый метаболизм (Шишкин, 2004).

Миостатин синтезируется в скелетных мышцах как пропептид, состоящий из 375 аминокислот, и расщепляется на N-концевой пропептид и C-концевой зрелый белок (109 а.к.). Димер зрелого белка, образованный с помощью дисульфидной связи, обладает функциональной активностью. Зрелый МСТ определяется в плазме крови как иммунореактивный белок. Свою биологическую функцию МСТ осуществляет через взаимодействие с трансмембранным рецептором ActR2B (рецепторы активина типа 2B, активины, факторы роста и дифференцировки, принадлежат к суперсемейству TGF- β) с последующей активацией каскада внутриклеточных биохимических процессов (McPherron et al., 1997; Lee, McPherron, 2001; Шишкин, 2004; Кукес и др., 2021). Агенты, способные блокировать сигнальный путь МСТ, могут иметь применение для лечения дегенеративных заболеваний мышц человека, а также для повышения мясной продуктивности животных.

В настоящее время ведутся поиск и разработка эффективных, безопасных и относительно недорогих блокаторов действия МСТ, которые можно было бы использовать в период откорма животных с целью повышения мясной продуктивности. Особое внимание уделяется современным биотехнологическим продуктам. Существуют разные пути блокирования действия эндогенного МСТ с использованием рекомбинантных белков. Растворимый рекомбинантный рецептор ActR2B, выделенный из экспрессирующей клеточной культуры, связывается со свободным МСТ и блокирует его способность активировать собственные клеточные рецепторы. За две недели после введения мышам их мышечная масса увеличивалась при максимальной дозе (50 мг/кг) на 60% (Lee et al., 2005). Инъекция моноклональных антител, обладающих высоким сродством к МСТ, приводила к увеличению мышечной массы, плотности костной ткани у разных видов млекопитающих и птицы. Так, после внутримышечной инъекции рекомбинантных нанотел к овечьему миостатину у мышей наблюдали значительное увеличение массы скелетных мышц; введённые антитела к овечьему МСТ ингибировали эндогенный МСТ и у мышей (Ou et al., 2020).

Вместо дорогостоящих антител гораздо выгоднее использовать рекомбинантный миостатин (pMST) в составе вакцины для образования антител к эндогенному белку самим организмом. Введение свиного pMST мышам вызывало иммунную реакцию с выработкой антител, блокирующих как чужеродный, так и собственный белок; в результате вакцинации у мышей увеличивалась масса тела за счёт повышения роста мышечной ткани (Tang et al., 2007; Zhang et al., 2011, 2012). Кодирующая последовательность свиного pMST была субклонирована в вектор экспрессии дрожжей, управляемый индуцируемым медью промотором. Пероральное введение с кормом и инъекция термоубитой цельной рекомбинантной вакцины на основе *Saccharomyces cerevisiae* давали схожий по эффективности иммунный ответ, который измерялся по наличию специфичных к МСТ антител в сыворотке крови (Zhang et al., 2011, 2012). Аналогичный результат был получен и на кроликах (Liu et al., 2016). Эффективным оказалось включение в целевой ДНК-вектор дрожжевой вакцины комбинированного вектора shIL21-MSTN под cmv-промотором (shIL21 – короткая шпилька РНК-IL21). Титр антител, специфичных к МСТ, был намного выше, чем включение одного cmv-MSTN. Сообщается о получении pMST яка, экспрессированного в *E. coli* с хорошим выходом (содержание целевого белка составляло 21% от общего количества продуктов экспрессии). После иммунизации им кроликов ИФА показал высокий титр антител против pMST яка (Xu et al., 2012).

Выращивание продуктивного скота с помощью иммунорегуляторного метода может быть достаточно эффективным (Zakria et al., 2019). В настоящее время активно разрабатываются способы ингибирования активности МСТ на разных уровнях (Nielsen et al., 2021):

- системное введение антител против МСТ;

- сверхэкспрессия или введение пропептида МСТ (пропептид является ингибитором функционально активного димера зрелого белка);
- системное введение рецептора ActR2B; введение антител против ActR2B;
- сверхэкспрессия или введение фоллистатина, ингибитора МСТ;
- использование РНК-интерференции и анти-олигонуклеотидов против МСТ ActR2B;
- редактирование гена МСТ с использованием системы AAV-Cas9 (система редактирования CRISPR/Cas с использованием аденоассоциированного вируса для доставки её компонентов).
- получение трансгенных животных-моделей с нокаутом гена миостатина.

Цель данного исследования – получение бактериального штамма-продуцента рМСТ овцы, который может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных и птицы за счёт индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину, блокирования его действия с последующим увеличением массы мышц. Для достижения цели на первом этапе была поставлена задача получить плазмиду для экспрессии рМСТ и штамм-продуцент *E.coli*, экспрессирующий рекомбинантный белок (РБ).

Материал и методы

Реактивы и оборудование. В работе использовались: спектрофотометр UV – 2100, шейкер-инкубатор; гомогенизатор ультразвуковой; рН – метр; ПЦР-амплификатор Терцик; комплект оборудования для хроматографии производства фирмы LKB; прибор для электрофореза SE 250 производства Hoefer Scientific Instruments; набор оборудования для проведения электрофореза в агарозном геле; микроцентрифуга настольная; термостат настольный гнездовой для пробирок типа эппендорф; бокс ламинарного типа для работы с бактериальными культурами.

Синтетический ген, кодирующий белок зрелого МСТ, был заказан в ООО Евроген.

Рестрикция. Рестрикцию плазмиды рЕТ28a(+) и синтетического гена осуществляли рестриктазами BamHI и XhoI в буфере Tango: сначала 1x для BamHI (37°C, 3 часа); затем добавлением 10x буфера Tango до 2x – вносили XhoI и инкубировали ещё 2 ч. В рестриктной смеси синтетического гена рестриктазы инактивировали нагреванием. Фрагменты BamHI/MSTN/XhoI и BamHI/рЕТ-28a(+)/XhoI очищали с использованием набора Cleanup S-Cap (BC041S), предназначенного для очистки ДНК из любых ферментативных реакционных смесей и всех типов агарозных гелей (ООО Евроген). Концентрацию ДНК-фрагментов определяли методом последовательных разведений, используя в качестве контроля раствор стандартной плазмиды с известной концентрацией и оценкой методом электрофореза в агарозном геле.

Лигирование. Очищенные фрагменты с липкими BamHI-XhoI концами лигировали по схеме: 1 мкл плазмиды (около 25 нг/мкл) смешивали с 4 мкл синтетического гена (около 15 нг/мкл), добавляли 1 мкл лигирующего буфера (x10 лигирующий буфер), 2 мкл T4 ДНК лигазы и 2 мкл воды (всего 10мкл). Лигазную смесь инкубировали при 22°C в течение часа; T4 ДНК лигазу инактивировали при 65°C в течение 10 мин. Лигазную смесь сразу же использовали для химической трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3).

Трансформация. Был применен упрощенный метод химической трансформации с использованием 0,1M CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). К суспензии свежеполученных химически компетентных клеток *E. coli*. BL21 (DE3) (50 мкл, на льду) добавляли 3 мкл лигазной смеси, выдерживали на льду 30 мин. Суспензию подвергали термическому шоку 42°C в течение 65 сек., переносили на лёд, выдерживали 2 мин. К клеткам добавляли 500 мкл среды LB (1% триптона, 0.5% экстракта дрожжей; 1% NaCl) и инкубировали 1,5 ч при 37°C в термощейкере. Центрифугировали, удаляли 500 мкл фугата. Осадок ресуспендировали, по 15 и 30 мкл клеток рассеивали в чашки Петри на среду LB с агаром (1,5%) и канамицином (60 мкг/мл), инкубировали в течение ночи при 37°C. Выросшие клоны (рис. 8) проверяли на наличие вставки размером 616 п.н. методом ПЦР со стандартными праймерами T7f/T7rev ЗАО Синтол <<http://www.syntol.ru>>.

Полимеразная цепная реакция. Состав ПЦР-смеси (на одну пробу, 20 мкл): Taq buf x10 (200 mM Трис-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 15mM MgCl₂) – 2 мкл, dNTP x10 (2 mM) – 2 мкл, праймеры T7f/T7r – по 1 мкл, ДНК – 1 мкл, TaqPol (5 ед/мкл) – 0,3 мкл, вода – 13,7 мкл. Смесь покрывалась двумя 20 мкл минерального масла после чего инкубировалась в термоциклере в течение 25 циклов: денатурация – 94°C, 45 сек., отжиг – 62°C, 30 сек.; элонгация – 72°C, 45 сек.

Электрофорез ПЦР-ампликонов проводили в горизонтальном 0,8% агарозном геле в 0,5х трис-боратном буфере с бромистым этидием (400 нг/мл), используя набор оборудования фирмы Hoeffer (США). Гели просматривали при помощи трансиллюминатора при длине волны 260 нм. Фотографирование проводилось с помощью видеосистемы Vitran (Россия). Для определения размеров фрагментов более 500 п.н. в качестве молекулярно-весового стандарта использовался GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). Полосы ДНК визуализовали в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе.

Биосинтез рекомбинантного белка в клетках E. coli. Одну из проверенных колоний переносили в 5 мл жидкой среды LB (триптон, 10 г/л; экстракт дрожжей, 5 г/л; NaCl, 10 г/л) с канамицином н (60 мкг/мл), инкубировали в течение ночи при 37°C. По 1 мл ночной культуры *E. coli* B121/pET28-MSTN вносили в 100 мл LB с антибиотиком, колбы помещали в термошейкер, культуру выращивали в течение нескольких часов. При достижении культурой оптической плотности (ОП) 0,1-0,6 о.е. при длине волны 595 нм, индуцировали экспрессию РБ добавлением в культуру ИПТГ (0,25 М спиртовой раствор) до 1 mM. После индукции бактерии культивировали еще в течение нескольких часов. Перед индукцией отбирали 1 мл неиндуцированной культуры для анализа. После индукции экспрессии из культуры отбирали пробы через разные промежутки времени по 1 мл. Измеряли ОП суспензии.

Анализ проб на присутствие в них РБ. Для проведения белкового электрофореза в ПААГ образцы нормализовали по содержанию белка. В зависимости от оптической плотности меньший или больший объем пробы смешивали в соотношении 1:1 с 2х образцовым буфером (БО) (4% SDS, 2-меркаптоэтанол, 10%, глицерин, 20%, 0,125 М Трис-НСl, рН 6,8, бромфеноловый синий 0.1%). Прогревали при 95°C. В лунку концентрирующего геля наносили по 30 мкл подготовленного образца.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез белковых образцов осуществляли в 12,5% и 15% ПААГ. Подготовленные образцы вносили в лунки. В одну из лунок вносили маркеры молекулярной массы (Precision Plus Protein Unstained, 10-250kDa, BioRad). При силе тока 30 мА проводили электрофорез до тех пор, пока белки не достигали границы концентрирующего и разрешающего геля. После этого меняли силу тока на 40 мА. После окончания фореа гель окрашивали в растворе Кумасси (0,125% кумасси R250; уксусная кислота 10%; метанол 50%) в течение 4 ч, после чего гель переносили в отмывочный раствор 1 (50% метанол; 10% уксусная кислота) на 1 час, выдерживали в отмывочном растворе 2 (5% метанол; 7% уксусная кислота) до 6 ч.

Результаты и обсуждение

Поскольку практически у всех сельскохозяйственных животных аминокислотная последовательность МСТ идентична, в качестве модельного животного для изучения иммуногенности рМСТ использовали овцу. Период выращивания и откорма мелкого скота длится 5-6 месяцев, что позволяет в приемлемые сроки оценить не только иммуногенность рМСТ, но и эффективность его влияния на рост мышечной ткани у молодняка.

Ген MSTN овцы, выбор последовательности для кодирования рекомбинантного белка.

Ген МСТ овцы находится на 2-й хромосоме, содержит 3 экзона и кодирует белок препромиостатин, состоящий из 365 аминокислот (из них 23 – сигнальный пептид). Для получения РБ была выбрана аминокислотная последовательность зрелого МСТ овцы, образующегося в результате протеолитического расщепления промиостатина на пропептид и зрелый МСТ (109 а.к.) (рис. 1).

260	270	280	290	300
PFLEVKVTDI	PKRSRRDFGL	DC ¹ DEHSTESR	C ² C ¹ RYPLTVDF	EAFGWDWIIA
310	320	330	340	350
PKRYKANYS ³ S	GEC ⁴ EFLFLQK	YPHTHLVHQ	NPKGSAGPC ⁵ C ²	TPTKMSPINM
360	370			
LYFNGKEQII	YGKIPGMVVD	RC ³ GC ⁴ S		

Рис. 1. Аминокислотная последовательность зрелого миостатина (выделено заливкой). RSRR – расщепляемая последовательность. Sn- образование внутримолекулярных дисульфидных связей, C*--S-S- связь с образованием активного димера (скриншот <https://www.uniprot.org/uniprot/O18830>)

Все аминокислоты, кроме триптофана, кодируются более чем одним кодоном. Синонимичные кодоны используются у разных организмов с различной частотой. У млекопитающих и у *E. coli* типы предпочтения кодонов различаются. Исследование частоты применения кодонов в 4 290 генах *E. coli* показало, что одни из синонимичных кодонов используются реже, чем другие (Novy et al., 2001). Клонированные гены, обогащенные редкими для *E. coli* кодонами, часто неэффективно экспрессируются в ней из-за нехватки соответствующих тРНК (Macrides, 1996).

Анализ последовательности кодонов для синтеза рМСТ в *E. coli* в программе Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>) показал низкую частоту встречаемости для 13 кодонов из 109 (12%) (рис.2), что могло бы существенно снизить эффективность синтеза РБ при использовании оригинальной кодирующей последовательности, клонированной в плазмиду-вектор. Так, глицин оказался представленным редкими для *E. coli* кодонами GGA и GGG с частотой встречаемости 0,12 и 0,16 соответственно, вместо часто используемых синонимичных кодонов GGT и GGC (0,33 и 0,39).

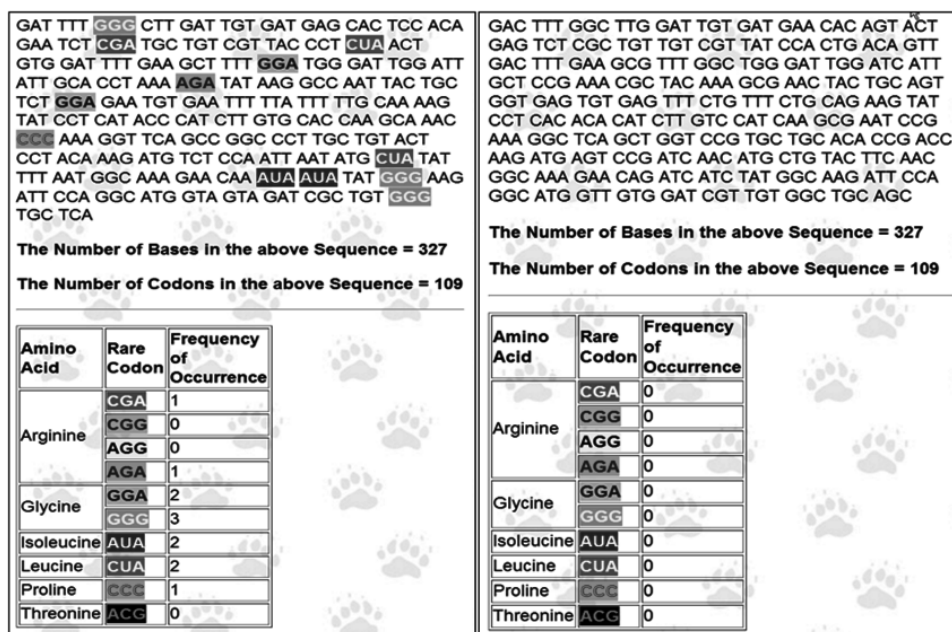


Рис. 2. Результаты проверки эффективности кодонов в программе Rare Codon Caltor. Слева – кодоны гена зрелого МСТ овцы, справа – последовательность, адаптированная к транскрипции в *E. coli* (скриншоты).

Последовательность синтетического гена, кодирующего зрелый МСТ, была оптимизирована для эффективной экспрессии в *E. coli* и фланкирована сайтами для клонирования в плазмиду-вектор рЕТ-28a(+): ggatcc – XhoI, ctcgag – BamHI (рис. 3, 4).

Наиболее распространённые экспрессионные плазмиды являются результатом множества комбинаций репликонов, промоторов, маркеров отбора, нескольких сайтов клонирования и стратегий удаления слитого белка. Промоторная система T7, присутствующая в рЕТ-векторах, способна давать высокую экспрессию РБ: целевой белок может составлять 50% от общего клеточного белка. В этой системе целевой ген клонируется за промотором, распознаваемым РНК-полимеразой фага T7 (рис. 3, 4).

В программе Vector NTI транслированная аминокислотная последовательность полностью соответствует сиквенсу зрелого МСТ овцы, тогда как схожесть исходной нуклеотидной и адаптированной последовательностей составляет 78,3% (рис. 5).

Запланированный рекомбинантный белок содержит 143 аминокислоты, кодирующие: 6xHis (полигистидиновый тэг для очистки на Ni-сефарозе); тромбиновый сайт, T7 тэг (11 а.к.), последовательность МСТ, соответствующая зрелому миостатину (109 аминокислот, выделено заливкой). Теоретическая молекулярная масса 15,92 кДа.

Плазмида-вектор для экспрессии рекомбинантного МСТ

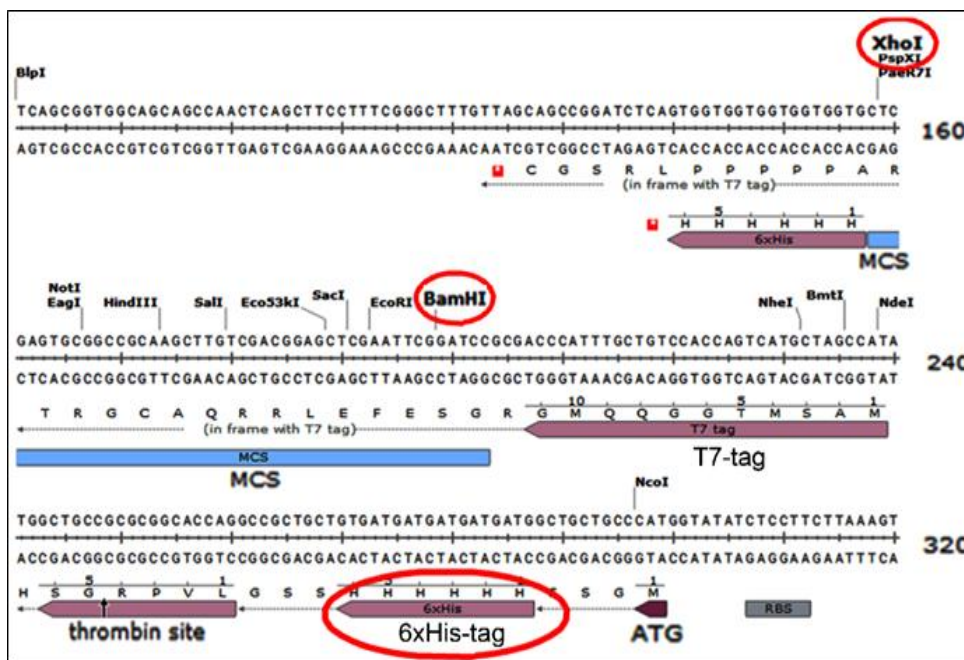


Рис. 3. Схема фрагмента клонирования/экспрессии плазмиды pET-28a(+). Указаны: начало синтеза РБ (ATG), 6xHis тэг, тромбиновый сайт, T7 тэги, сайт мультиклонирования (MCS), использованные для клонирования сайты рестрикции BamHI - XhoI (модифицированный скриншот окна программы SnapGene Viewer).

Синтетический ген MSTN и pET-28a(+) были обработаны рестриктазами XhoI и BamHI. Очищенные фрагменты BamHI/MSTN/XhoI и BamHI/ pET-28a(+)/XhoI лигировали, в результате была получена плазмида pET-28a(+)-MSTN (рис. 4).

Структура фрагмента плазмиды pET-28a(+)-MSTN, кодирующего рМСТ с функциональными тэгами, трансляция нуклеотидной последовательности в аминокислотную последовательность рекомбинантного белка представлена на рис. 5.

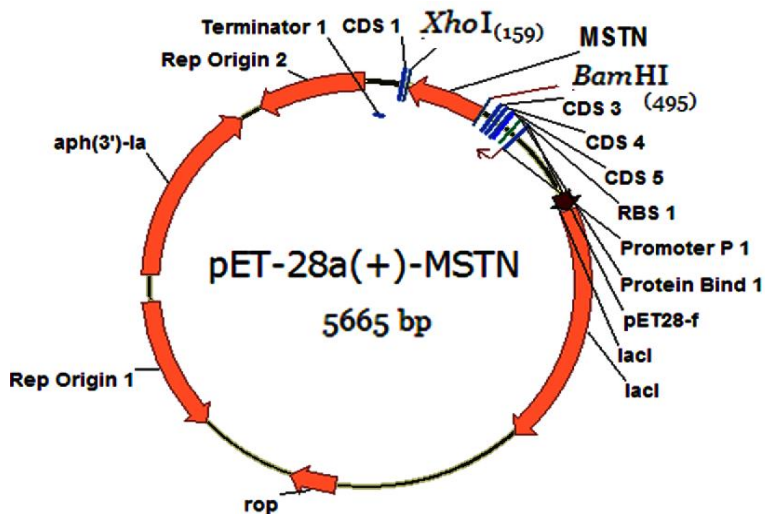


Рис. 4. Схема плазмиды pET-28a(+)-MSTN, содержащей адаптированную к транскрипции в E. coli нуклеотидную последовательность (MSTN) зрелого МСТ. Указаны основные элементы плазмиды (модифицированный скриншот окна программы Vector NTI).

101	CTCAGCTTCC TTTCGGCTT TGTTAGCAGC CGGATCTCAG TGGTGGTGGT GGTGGTGTCTC GAGTTAGGAG CAGCCACAC CAGCCACAC CATGCGCTGGA GAGTCGAAGS AAGGCCCGAA ACAATCGTGC GCCTAGAGTC ACCACCACCA CCACCAGGAG CTCATCCTC GTCGGTGTG CTAGGTGTG GTACGGACCT	XhoI *****
-1		*** Ser Cys Gly Cys Arg Asp Val Val Met Gly Pro Ile
201	ATCTTGCCAT AGATGATCTG TTCTTTGCCG TTGAAGTACA GCATGTGTAT CGGACTCATC TTGGTCGGTG TGCAGCACGG ACCAGCTGAG CCTTTCGGAT TAGAACGGTA TCTACTAGAC AAGAAACGGC AACTTCATGT CGTACAACTA GCCTGAGTAG AACCAGCCAC ACGTCGTGCC TGGTCGACTC GGAAGCCCTA	
-1		Ile Lys Gly Tyr Ile Ile Gln Glu Lys Gly Asn Phe Tyr Leu Met Asn Ile Pro Ser Met Lys Thr Pro Thr Cys Cys Pro Gly Ala Ser Gly Lys Pro Asn
301	TGGCTTGATG GACAAGATGT GTGTGAGGAT ACTTCTGCAG AAACAGAAAC TCACACTCAC CACTGCAGTA GTTCGCTTTG TAGCGTTTCG GAGCAATGAT AGCGAAGTAC CTGTTCTACA CACACTCCTA TGAAGAGGTC TTTGTCTTTG AGTGTGAGTG GTGACGTCAT CAAGCGAAAC ATCGCAAGC CTCGTTACTA	
-1		Asn Ala Gln His Val Leu His Thr His Pro Tyr Lys Gln Leu Phe Leu Phe Glu Cys Glu Gly Ser Cys Tyr Asn Ala Lys Tyr Arg Lys Pro Ala Ile Ile
401	CCAATCCAG CCAACCGCTT CAAAGTCAAC TGTCAAGTGA TACCGACAC AGCGAGACTC AGTACTGTGT TCATCACAAT CCAAGCCAAA GTCGGATCCG GGTAGGGTC GGTITGCGAA GTTTCAGTTG ACAGTCACCT ATTGCTGTG TCGCTCTGAG TCATGACACA AGTAGTGTTA GGTTCGGITT CAGCCTAGGC	BamHI *****
-1		Trp Asp Trp Gly Phe Ala Glu Phe Asp Val Thr Leu Pro Tyr Arg Cys Cys Arg Ser Glu Thr Ser His Glu Asp Cys Asp Leu Gly Phe Asp Ser Gly Arg
501	CGACCCATT GCTGTCCACC AGTCATGCTA GCCATATGGC TGCCGCGCGG CACCAGGCCG CTGCTGTGAT GATGATGATG ATGGCTGCTG CCCATGGTAT GCTGGSTAAA CGACAGSTGG TCACTAGCAT CGGTATACCG ACGGCGCGCC GTGGTCCGGC GACGACACTA CTACTACTAC TACCGACGAC GGSTACCATA	
-1		Arg Gly Met Gln Gln Gly Gly Thr Met Ser Ala Met His Ser Gly Arg Pro Val Leu Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Met

Рис. 5. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности рМСТ (нижняя ДНК-цепь, справа (снизу) налево (вверх)). Рекомбинантный белок содержит 143 аминокислоты: 6xHis (полигистидиновый тэг для очистки на Ni-сефарозе); тромбиновый сайт, T7 тэг (11 а.к.), последовательность рекомбинантного белка, соответствующего зрелому МСТ (109 аминокислот, выделено заливкой). Теоретическая молекулярная масса 15,92 кДа. Скриншот фрагмента окна программы Vector NTI.

Основные физико-химические показатели рМСТ

В он-лайн программе PROTPARAM (<https://www.protparam.net/index.html>) были рассчитаны основные физико-химические показатели потенциального рМСТН.

Средняя молекулярная масса: 15923.0794 Да.

Заряд и гидрофобность: отрицательно заряженные а.о. (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) = 12 (8.39%).

Положительно заряженные а.о. (лизин, аргинин и гистидин) = 24 (16.78%).

Полярные (гидрофильные) а.о. (C, S, Q, N, T, Y) = 43 (30.07%).

Гидрофобные а.о. (A, G, I, L, M, P, F, W, V) = 64 (44.76%).

Алифатический индекс: 49.79.

Общее среднее значение гидропатичности (GRAVY): -0.490.

Алифатический индекс белка определяет относительный объем, занимаемый алифатическими боковыми цепями следующих аминокислотных остатков: аланин, валин, лейцин и изолейцин. Чем выше алифатический индекс, тем выше термостабильность глобулярных белков. Значение GRAVY для белка или пептида вычисляют путем сложения значений гидропатии для каждого аминокислотного остатка и деления на количество остатков в последовательности или на длину последовательности. Увеличение положительного балла указывает на более высокую гидрофобность (Богомолова и др., 2016).

Коэффициент экстинкции: 19940.

Оптическая плотность раствора рМСТ 1мг/мл (62.802 мкМ) при длине волны 280 нм составляет 1.25 о.е.

Изоэлектрическая точка рКа, определённая разными методами: 7.75 и 7.42.

Получение бактериального штамма-продуцента рМСТ

Для производства рекомбинантных белков широко применяется бактериальная система *E. coli*. Наиболее часто используется штамм *E. coli* BL21 (DE3): в нём отсутствуют Lon-протеазы, которые разрушают многие чужеродные белки, и протеаза внешней мембраны OmpT, функция которой заключается в разрушении внеклеточных белков, что позволяет избежать деградации целевого белка (Rozkov, Enfors 2004). Потеря экспрессирующей плазмиды предотвращается благодаря мутации hsdSB, присутствующей в штамме BL21. В результате нарушается метилирование и деградация ДНК. Чаще всего штамм BL21(DE3) используется вместе с плазмидой - вектором и системой экспрессии, основанной на промоторе T7, с высокой скоростью транскрипции. Целевой белок транскрибируется фаговой T7 РНК- полимеразой, которая быстрее по сравнению с нативными полимеразы *E. coli*. В штамме BL21(DE3) профаг λDE3 интегрирован

в хромосому BL21 и содержит ген T7 RNAP под промотором lacUV5. Система T7 индуцируется однократным добавлением ИПТГ (Rosano et al., 2014). Клетки *E. coli* не способны гидролизовать ИПТГ, для эффективной индукции требуется его низкая концентрация 0,1–2,0 мМ. Таким образом создается система сверхэкспрессии РБ: чем больше синтезируется мРНК, тем больше белка может быть произведено. Однако эта система не подходит для токсичных РБ.

Первый этап получения штамма-продуцента – трансформация *E. coli* плазмидой, несущей целевой ген. Наиболее доступным является метод химической трансформации: клетки приобретают способность поглощать плазмидную ДНК извне, т.е. становятся компетентными. Для трансформации штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3) лигазной смесью был применён упрощённый метод химической трансформации с использованием 0,1М CaCl₂.

Выросшие на селективной канамицин-содержащей среде ЛБ-агароза клоны проверяли на наличие вставки размером 616 п.н. методом ПЦР со стандартными праймерами T7f/T7rev. Один из клонов использовали для подбора условий выращивания, индукции и наработки рМСТН.

Подбор условий культивирования. Проверка эффективности индукции синтеза РБ.

При подборе условий роста штамма-продуцента с целью оптимизации наработки рекомбинантного белка учитывали следующие факторы: 1) доля рМСТ в суммарном бактериальном белке, 2) содержание РБ в общем объёме клеточной культуры.

При проверке эффективности индукции синтеза рМСТ определяли влияние введения ИПТГ на рост культуры-продуцента *E. coli* BL21/pET28-MSTN и эффективность синтеза рМСТ. Введение ИПТГ приводило к резкому замедлению роста клеточной культуры в сравнении с контролем (рис. 6), что свидетельствовало о переключении метаболических процессов бактерии на синтез РБ (фото 1).

Методом ПААГ-электрофореза было показано, что *E. coli* BL21/pET28-MSTN при индукции 1 мМ ИПТГ экспрессирует РБ массой около 16 кДа, что соответствует вычисленному значению.

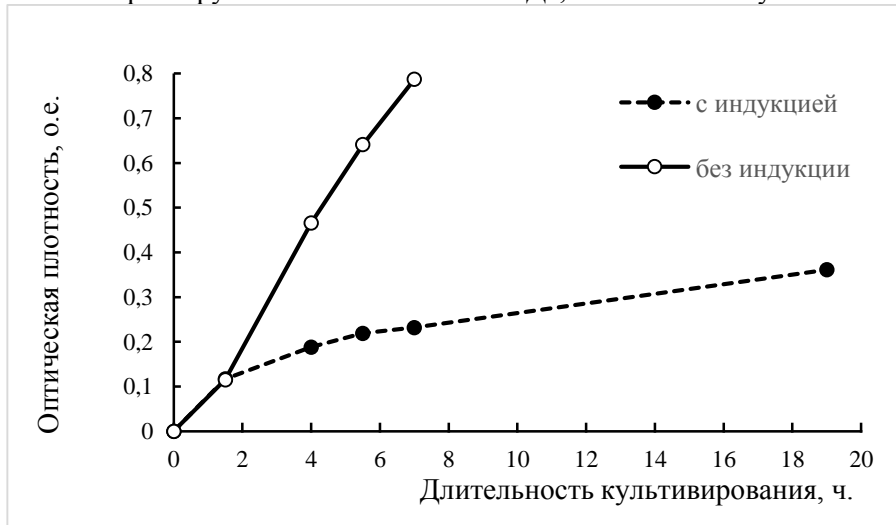


Рис. 6. Динамика роста продуцирующей культуры без добавления и с добавлением индуктора ИПТГ через 1,5 ч. после начала культивирования.

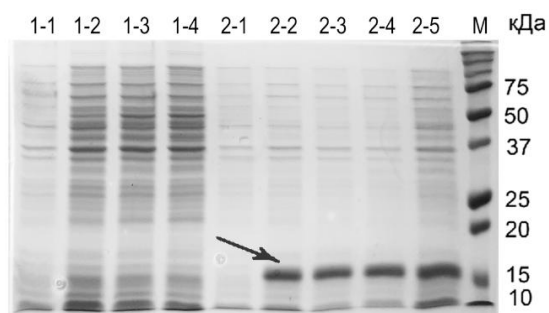


Фото 1. ПААГ электрофорез (12,5%) образцов клеточной суспензии: Пробы 1-1 – 1-4 – без индукции, пробы 2-1-2-5 – ИПТГ-индукция. Образцы 1-1 и 2-1 взяты в момент введения ИПТГ (1,5 часа) при одинаковой плотности культуры. Стрелкой обозначена полоса рекомбинантного белка.

Проверка влияния времени введения ИПТГ на эффективность экспрессии рМСТ.

С целью увеличения выхода рМСТ проверяли эффективность синтеза белка в зависимости от времени введения ИПТГ в культуру (табл. 1, фото 2).

При более поздней индукции культуры *E. coli* В121/рЕТ28-MSTN доля рМСТ (и, соответственно, его чистота) в суммарном бактериальном белке снижается (табл. 1, фото 2).

Таблица 1. Зависимость оптической плотности клеточной суспензии от времени внесения в клеточную культуру индуктора ИПТГ

Продолжительность культивирования, ч	Оптическая плотность, о.е.							
	0	1,5	3	4	5	5,5	7	10
Ранняя индукция	0	0,146			0,223			0,271
Средняя индукция	0		0,465			0,717		0,752
Поздняя индукция	0			0,627			0,737	0,899

Примечание: оптическая плотность во время внесения ИПТГ выделена жирным шрифтом.

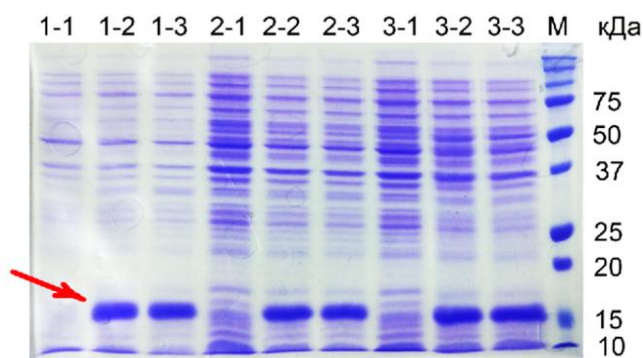


Фото 2. ПААГ электрофорез (12,5%) образцов клеточной суспензии.

Пробы 1-1 – 1-3 – ранняя индукция ИПТГ; пробы 2-1-2-3 – средняя; пробы 3-1-3-3 – поздняя индукция.

Стрелкой обозначена полоса рекомбинантного белка.

Ранняя индукция на стадии низкой оптической плотности (0,15 о.е.) приводила к высокому содержанию рМСТ в суммарном бактериальном белке (50-60%), но низкому выходу бактериальной биомассы. При индукции на более поздних стадиях (0,47-0,63 о.е.) относительная доля рМСТ снижалась. Длительность культивирования при 37°C до прекращения роста биомассы была 6-7 часов. Исходя из полученных результатов, оптимальной является индукция экспрессии на уровне роста бактериальной массы, соответствующем 0,25-0,30 о.е. с более длительной инкубацией при температурах ниже 37°C.

Заключение

При использовании в составе генетической конструкции оптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей белок зрелого МСТ, получен штамм-продуцент *E. coli* В121/рЕТ28-MSTN, при индукции которого наблюдали высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка. Рекомбинантный МСТ, полученный при культивировании в одном из использованных режимов, может быть использован в качестве антигена при минимальной обработке животных для индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному МСТ с целью блокирования его действия и повышения мясной продуктивности животных.

Список литературы

1. Богомолва Т.Г., Добровольская О.А., Мировская А.А., Аль-Шехадат Р.И., Федорова Е.А., Духовлинов И.В., Симбирцев А.С. Разработка кандидатной субстанции рекомбинантного белка CRM197. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2016. Т. 15. № 1. С. 93-98. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-93-98
2. Кукес В.Г., Газданова А.А., Фуралев В.А., Маринин В.Ф., Перков А.В., Ленкова Н.И., Соловьева С. А., Рязанцева О.В. Современное представление о биологической роли и клиническом

- значении миостатина – главного регулятора роста и дифференцировки мышц. // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2021. Т. 16. № 3. С. 327-332. DOI: 10.14300/mnnc.2021.16079
3. Шишкин С.С. Миостатин и некоторые другие биохимические факторы, регулирующие рост мышечных тканей у человека и ряда высших позвоночных. // Успехи биологической химии. 2004. № 44. С. 209-262.
 4. Bongiorni S., Valentini A., Chillemi G. Structural and dynamic characterization of the c313y mutation in myostatin dimeric protein, responsible for the "double muscle" phenotype in piedmontese cattle. // *Front. Genet.* 2016. Vol. 7. nr 14. P. 1-8. DOI: 10.3389/fgene.2016.00014.
 5. Chen Y.S., Guo Q., Guo L.J., Liu T., Wu X.P., Lin Z.Y., He H.B., Jiang T.J. GDF8 inhibits bone formation and promotes bone resorption in mice. // *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 2017. Vol. 44. nr 4. P. 500-508. DOI: 10.1111/1440-1681.12728.
 6. Chen M.M., Zhao Y.P., Zhao Y., Deng S.L., Yu K. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. Vol. 9. Art. 785712. P. 1-10. DOI: 10.3389/fcell.2021.785712.
 7. Jackson M.F., Luong D., Vang D. D., Garikipati D. K., Stanton J. B., Nelson O. L., Rodgers B. D. The aging myostatin null phenotype: reduced adiposity, cardiac hypertrophy, enhanced cardiac stress response, and sexual dimorphism. // *J. Endocr.* 2012. Vol. 213. nr 3. P. 263-275. DOI: 10.1530/JOE-11-0455
 8. Lee S.-J., McPherron A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2001. Vol. 98. nr 16. P. 9306-9311. DOI: 10.1073/pnas.151270098.
 9. Lee S.J., Reed L.A., Davies M.V., Girgenrath S., Goad M.E., Tomkinson K.N., Wright J.F., Barker C., Ehrmantraut G., Holmstrom J., Trowell B., Gertz B., Jiang M.S., Sebald S.M., Matzuk M., Li E., Liang L.F., Quattlebaum E., Stotish R.L., Wolfman N.M.. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. nr 50. P. 18117-18122. DOI: 10.1073/pnas.0505996102.
 10. Liu Z., Zhou G., Ren C., Xu K., Yan Q., Li X., Zhang T., Zhang Z. Oral administration of myostatin-specific recombinant *Saccharomyces cerevisiae* vaccine in rabbit. // *Vaccine.* 2016. Vol. 34. nr 20. P. 2378-2382. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.03.036.
 11. Macrides S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. // *Microb. Rev.* 1996. Vol. 60. nr 3. P. 512-538. DOI: 10.1128/mr.60.3.512-538.1996.
 12. Marbach A., Bettenbrock K. Lac operon induction in *Escherichia coli*: systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. // *J. Biotech.* 2012. Vol. 157. nr 1. P. 82-88. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.009.
 13. McPherron A.C., Lee S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1997a. Vol. 94. nr 23. P. 12457-12461. DOI: 10.1073/pnas.94.23.12457.
 14. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member // *Nature.* 1997. Vol. 387. nr 6628. P. 83-90. DOI: 10.1038/387083a0
 15. Nielsen T.L., Vissing J., Krag T.O. Antimyostatin treatment in health and disease: the story of great expectations and limited success // *Cells.* 2021. Vol. 10. nr 3. P. 533. DOI: 10.3390/cells10030533.
 16. Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression // *Novations.* 2001. nr 12. P. 1-3.
 17. Ou K., Li Y., Wu P., Guo J., Hao X., Sheng J., Chen C. A novel nanobody directed against ovine myostatin to enhance muscle growth in mouse // *Animals (Basel).* 2020. nr 10. Art. 1398. P. 1-9. DOI: 10.3390/ani10081398.
 18. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // *Front. Microbiol.* 2014. nr 5. Art. 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.
 19. Rozkov A., Enfors S.O. Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli* // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004. nr 89. P. 163-195. DOI: 10.1007/b95567.
 20. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 479 p.
 21. Tang L., Yan Z., Wan Y., Han W., Zhang Y. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice // *Muscle Nerve.* 2007. Vol. 36. nr 3. P. 342-348. DOI: 10.1002/mus.20791.
 22. Xu Y., Mao L., Zheng Y. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of yak recombinant myostatin // *Anim. Biotechnol.* 2012. Vol. 23. nr 4. P. 253-60. DOI: 10.1080/10495398.2012.722157.

23. Zakria H.M., Han B., Yue F., Mu L., Fang Y., Li X., Xu K., Zhang Z. Significant body mass increase by oral administration of a cascade of shIL21-MSTN yeast-based DNA vaccine in mice // *Biomed. Pharmacother.* 2019. nr 118. Art. 109147. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109147.
24. Zhang T., Yang H., Wang R., Xu K., Xin Y., Ren G., Zhou G., Zhang C., Wang L., Zhang Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice // *Vaccine.* 2011. Vol. 29. nr 46. P. 8412-8416. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.007.
25. Zhang T., Sun L., Xin Y., Ma L., Zhang Y., Wang X., Xu K., Ren C., Zhang C., Chen Z., Yang H., Zhang Z. A vaccine grade of yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian myostatin // *BMC Biotechnol.* 2012. nr 12. Art. 97. DOI: 10.1186/1472-6750-12-97.

References (for publications in Russian)

1. Bogomolova E. G., Dobrovolskaya O. A., Mirovskaya A. A., Al-Shehadat R. I., Fedorova E. A., Dukhovlinov I. V., Simbirtsev A. S. [Development of pharmacology grade substance of recombinant protein CRM197]. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika (Epidemiology and vaccinal prevention)*. 2016. 15(1): 93-98. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-1-93-98
2. Kukes V.G., Gazdanova A.A., Furalyov V.A., Marinin V.F., Perkov A.V., Lenkova N.I., Solovieva S.A., Ryazantseva O.V. [Modern conception of myostatin biological role and clinical significance as the main regulator of muscle growth and differentiation]. *Meditinskii vestnik Severnogo Kavkaza (Medical news of North Caucasus)*. 2021. 16(3): 327-332. DOI: 10.14300/mnnc.2021.16079
3. Shishkin S.S. (Myostatin and some other biochemical factors regulating the growth of muscle tissues in humans and a number of higher vertebrates). *Uspekhi biologicheskoi khimii (Advances in biological chemistry)*. 2004. 44: 209-262.

UDC 636.32/38:577.21:575.117.2:57.063.8

**Towards the development of bioengineering methods
to enhance meat productivity of animals: constructing a bacterial
strain producing recombinant myostatin**

Koloskova E.M., Ezerskii V.A., Zhukova O.B.

*Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, branch
of Federal Research Center for Animal Husbandry, Ernst VIZh,
Borovsk, Kaluga oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. One of the manifestations of the physiological action of myostatin (MST) in animals is inhibiting the hyperplasia of the germinal muscle fibers (MF) during fetal development. In the postnatal period, the use of MST agonists activates the division of satellite cells, increases the number of MF nuclei and their thickness. Several variants of blocking the action of MST are known, one of them is the vaccination of animals with the aim of producing specific antibodies to endogenous myostatin, blocking its action and stimulating the growth of skeletal muscles. The aim of this work was to obtain a bacterial strain producing recombinant myostatin (rMST), the use of which as an antigen can stimulate the synthesis of specific antibodies to endogenous MST. The nucleotide sequence of mature sheep MST, optimized for effective expression of recombinant protein in *E. coli* strain BL21(DE3), was integrated into the pET-28a(+) vector plasmid. The conditions for cultivating the resulting producer strain were selected and the efficiency of inducing the synthesis of recombinant protein (RP) was tested. The resulting strain of *E. coli* BL21/pET28-MSTN expresses RP with a mass of about 16 kDa, which corresponds to the theoretical value. Early induction at the stage of culture growth at low optical density gave a high proportion of rMST in the total bacterial protein, but a low production of bacterial biomass. With induction at later stages (0.5-0.7 o.u.), the relative proportion of rMST decreased. The results obtained are supposed to be used to develop an immunobiotechnological method for increasing the meat productivity of animals using rMST.

Keywords: myostatin, recombinant protein, expression, producer strain, E. coli

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology), 2022, 4:49-60

Поступило в редакцию: 27.10.2022

Получено после доработки: 17.11.2022

Сведения об авторах:

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с., тел. 910590-92-83, heleko3@yandex.ru
Езерский Вадим Александрович, м.н.с., тел. 906642-59-92, ez.vadim@yandex.ru
Жукова Ольга Борисовна, н.с., тел. 910515-01-50, olgazhukova19801031@gmail.com