

Получение плазмиды и штамма-продуцента рекомбинантного миостатина.

*Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»
Боровск, Калужская обл., РФ*

Езерский Вадим Аркадьевич

**VII Международная научная конференция
«СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ, ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ АГРАРНОЙ НАУКИ»**

октябрь 2022 г.

Республика Крым, г. Симферополь



Технологии рекомбинантных ДНК позволяют получать и использовать для практической ветеринарии и промышленного животноводства белковые и пептидные препараты, значительно повысив их доступность.

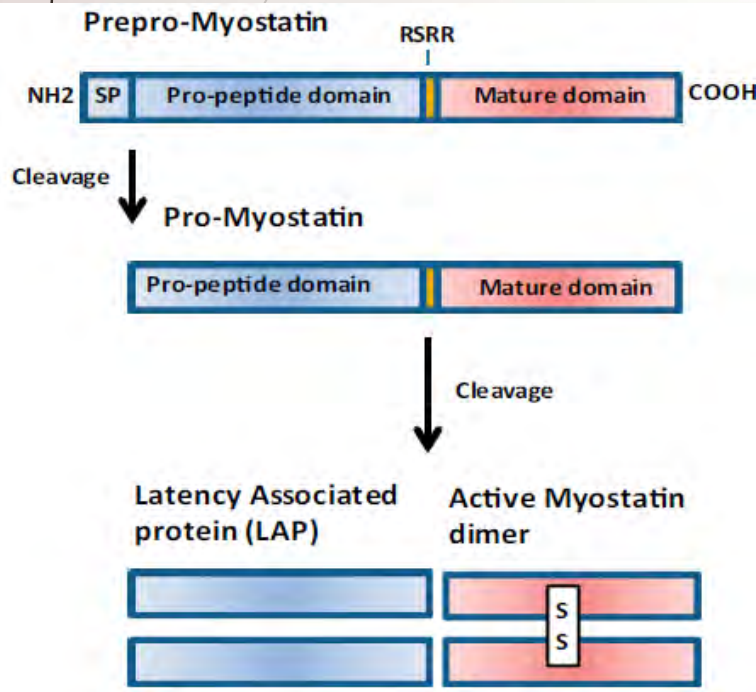
Один из самых распространенных методов для получения **рекомбинантных белков** - экспрессия рекомбинантных генов в клетках *E. coli*.

Способность **миостатина** ограничивать рост мышечной массы делает его потенциальной мишенью для продуктивного животноводства: животные, испытывающие недостаток миостатина или активности его действия в результате естественных мутаций, имеют значительно большую мышечную массу, чем обычные животные.

Белок миостатин. Структура, свойства, механизм действия

Миостатин вырабатывается в скелетных мышцах как белок-предшественник (**препропептид**, 375 ак), который расщепляется на N-концевой **пропептид** (243 ак) и C-концевой **зрелый белок** (109 ак).

В функциональном состоянии состоит из двух C-концевых мономеров, связанных двухцепочечной дисульфидной связью между остатками CYS339. Каждый мономер содержит четыре цистиновых узла (дисульфидные связи).



1. Препропептид (сигнальный пептид (SP) + пропептид + домен зрелого белка) расщепляется для удаления SP.
2. При гидролизе RSRR высвобождается пропептид (LAP, 42 кДа) и активный пептид (12 кДа).
3. Активный пептид димеризуется с образованием активного димера MSTN(24 Кда).
4. Пропептид нековалентно связывает димер , образуя комплекс и блокируя действие MSTN.
5. Металлопротеиназа BMP-1 расщепляет неактивный комплекс, высвобождая активный зрелый MSTN.

6. Зрелый миостатин секретируется в межклеточную среду, поступает в плазму крови, где его основная часть находится в комплексе с пропептидом, фоллистатином и фоллистатин родственными белками

Аминокислотная последовательность миостатина идентична у всех сельскохозяйственных животных.

Рекомбинантный миостатин (pMCTH), обладающий достаточной иммуногенностью в отношении миостатина как антигена, может быть использован для повышения мясной продуктивности сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, свиньи, лошади, кролики), птицы за счет индукции синтеза специфических аутоантител к эндогенному миостатину, блокирования его действия и, как следствие, стимуляции роста мышечной ткани.

Предполагаемый механизм действия **pMCTH** - временное блокирование активности эндогенного миостатина с помощью аутоантител.

Инъекционный препарат **pMCTH**, используемый как вакцина для индукции иммунного ответа, для повышения мышечной массы с/х животных может быть востребован в животноводстве.

Цель:

изучение возможности нейтрализовать действие эндогенного миостатина у овец для повышения мясной продуктивности с использованием иммунологического метода. Иммунизации животных рекомбинантным миостатином с образованием антител к эндогенному белку.

Задачи:

1. Получить **рекомбинантный миостатин**:

- Создать генетическую конструкцию для экспрессии белка рекомбинантного миостатина в штамме-продуcente E.coli;
- Получить штамм-продуцент E.coli и наработать рекомбинантный белок;

2. Разработать **тест-систему** для определения титра антител к миостатину в крови.

- Получить и очистить IgG овцы; получить аффинный сорбент с иммобилизованными овечьими антителами;
- IgG овцы иммунизировать кроликов для получения кроличьих антител против овечьих IgG;
- Получить аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы и их конъюгаты с пероксидазой хрена; оценить качество конъюгата и подобрать рабочее разведение для использования в ИФА;
- Подобрать условия проведения ИФА, оценить иммуногенность рекомбинантного миостатина у иммунизированных овец.

1. Выбор аминокислотной последовательности рекомбинантного белка .

База данных GeneBank

Аминокислотная последовательность зрелого белка миостатина овцы
(из NCBI Reference Sequence: NP_001009428.1)

**DFGLDCDEHS TESRCCRYPL TVDFEAFGWD WIIAPKRYKA NYCSGECEFL
FLQKYRHTHL VHQANPKGSA GPCCTPTKMS PINMLYFNGK EQIIYGKIPG
MVDRCGCS - 109 аминокислот**

**Нуклеотидная последовательность, кодирующая зрелый белок
миостатина овцы (из NCBI Reference Sequence: NC_056055.1)**

GAT	TTT	GGG	CTT	GAT	TGT	GAT	GAG	CAC	TCC
ACA	GAA	TCT	CGA	TGC	TGT	CGT	TAC	CCT	CTA
ACT	GTG	GAT	TTT	GAA	GCT	TTT	GGA	TGG	GAT
TGG	ATT	ATT	GCA	CCT	AAA	AGA	TAT	AAG	GCC
AAT	TAC	TGC	TCT	GGA	GAA	TGT	GAA	TTT	TTA
TTT	TTG	CAA	AAG	TAT	CCT	CAT	ACC	CAT	CTT
GTG	CAC	CAA	GCA	AAC	CCC	AAA	GGT	TCA	GCC
GGC	CCT	TGC	TGT	ACT	CCT	ACA	AAG	ATG	TCT
CCA	ATT	AAT	ATG	CTA	TAT	TTT	AAT	GGC	AAA
GAA	CAA	ATA	ATA	TAT	GGG	AAG	ATT	CCA	GGC
ATG	GTA	GTA	GAT	CGC	TGT	GGG	TGC	TCA	

2. Оптимизация кодонов последовательности рекомбинантного белка для экспрессии

Для экспрессии белка в *E. coli* некоторые кодоны являются редкими, что может ограничивать эффективность синтеза рекомбинантного белка.

При использовании синтетического гена для клонирования в экспрессирующий вектор, необходимо оптимизировать кодирующую последовательность

Codon Usage Tables

Codon Usage Table: Escherichia coli

Green = preferred codon

Second Position

		T	C	A	G	
First Position	T	TTT → Phe (F) 0.58	TCT → Ser (S) 0.14	TAT → Tyr (Y) 0.57	TGT → Cys (C) 0.45	T
		TTC → Phe (F) 0.42	TCC → Ser (S) 0.15	TAC → Tyr (Y) 0.43	TGC → Cys (C) 0.55	C
		TTA → Leu (L) 0.13	TCA → Ser (S) 0.14	TAA → * 0.59	TGA → * 0.33	A
		TTG → Leu (L) 0.13	TCG → Ser (S) 0.15	TAG → * 0.08	TGG → Trp (W) 1.00	G
	C	CTT → Leu (L) 0.11	CCT → Pro (P) 0.17	CAT → His (H) 0.58	CGT → Arg (R) 0.36	T
		CTC → Leu (L) 0.10	CCC → Pro (P) 0.13	CAC → His (H) 0.42	CGC → Arg (R) 0.37	C
		CTA → Leu (L) 0.04	CCA → Pro (P) 0.19	CAA → Gln (Q) 0.33	CGA → Arg (R) 0.07	A
		CTG → Leu (L) 0.49	CCG → Pro (P) 0.51	CAG → Gln (Q) 0.67	CGG → Arg (R) 0.11	G
	A	ATT → Ile (I) 0.50	ACT → Thr (T) 0.17	AAT → Asn (N) 0.47	AGT → Ser (S) 0.16	T
		ATC → Ile (I) 0.40	ACC → Thr (T) 0.41	AAC → Asn (N) 0.53	AGC → Ser (S) 0.27	C
		ATA → Ile (I) 0.09	ACA → Thr (T) 0.15	AAA → Lys (K) 0.76	AGA → Arg (R) 0.05	A
		ATG → Met (M) 1.00	ACG → Thr (T) 0.27	AAG → Lys (K) 0.24	AGG → Arg (R) 0.03	G
	G	GTT → Val (V) 0.26	GCT → Ala (A) 0.16	GAT → Asp (D) 0.63	GGT → Gly (G) 0.33	T
		GTC → Val (V) 0.21	GCC → Ala (A) 0.27	GAC → Asp (D) 0.37	GGC → Gly (G) 0.39	C
		GTA → Val (V) 0.16	GCA → Ala (A) 0.22	GAA → Glu (E) 0.68	GGA → Gly (G) 0.12	A
		GTG → Val (V) 0.37	GCG → Ala (A) 0.35	GAG → Glu (E) 0.32	GGG → Gly (G) 0.16	G

Third Position

Print...

Format: DNA

GCA → Ala (A)

Проверка и поиск редких для E. Coli кодонов на доступном специализированном веб-сервисе

<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>

Для проверки в окно программы введена оригинальная кодирующая последовательность: 13 нуклеотидных триплетов из 109 оказались редкими для E.coli

```
GAT TTT GGG CTT GAT TGT GAT GAG CAC TCC ACA GAA TCT CGA TGC TGT CGT TAC CCT CUA ACT GTG
GAT TTT GAA GCT TTT GGA TGG GAT TGG ATT ATT GCA CCT AAA AGA TAT AAG GCC AAT TAC TGC TCT GGA
GAA TGT GAA TTT TTA TTT TTG CAA AAG TAT CCT CAT ACC CAT CTT GTG CAC CAA GCAAAC CCC AAA GGT
TCA GCC GGC CCT TGC TGT ACT CCT ACA AAG ATG TCT CCA ATT AAT ATG CUA TAT TTT AAT GGC AAA GAA
CAA AUA AUA TAT GGG AAG ATT CCA GGC ATG GTA GTA GAT CGC TGT GGG TGC TCA
```

The Number of Bases in the above Sequence = 327

The Number of Codons in the above Sequence = 109

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	1
	CGG	0
	AGG	0
	AGA	1
Glycine	GGA	2
	GGG	3
Isoleucine	AUA	2
Leucine	CUA	2
Proline	CCC	1
Threonine	ACG	0

Вывод: ПЦР-амплификация нуклеотидной последовательности зрелого белка не подходит для получения штамма-продуцента рекомбинантного белка. Необходим синтетический ген с оптимизированной последовательностью.

2. Заказ «синтетического гена» в специализированной фирме

Предложенный нам сиквенс:

ggatccGACTTTGGCTTGGATTGTGATGAACACAGTACTGAGTCTCGCTGTTGT**AGG**TATCCAC
TGACAGTTGACTTTGAAGCGTTTGGCTGGGATTGGATCATTGCTCCGAAACGCTACAAAGCGAA
CTACTGCAGTGGTGAGTGTGAGTTTCTGTTTCTGCAGAAGTATCCTCACACACATCTTGTCCAT
CAAGCGAATCCGAAAGGCTCAGCTGGTCCGTGCTGCACACCGACCAAGATGAGTCCGATCAACA
TGCTGTA CTTCAACGGCAAAGAACAGATCATCTATGGCAAGATTCCAGGCATGGTTGTGGATCG
TTGTGGCTGCAGC**taactcgag**

Результаты проверки показали присутствие мало используемого для аргинина кодона AGG – 0,03 (скриншот окна программы Caltor)

Amino Acid	Rare Codon	Frequency of Occurrence
Arginine	CGA	0
	CGG	0
	AGG	1
	AGA	0
Glycine	GGA	0
	GGG	0
Isoleucine	AUA	0
Leucine	CUA	0
Proline	CCC	0
Threonine	ACG	0

Оптимизированная последовательность

ggatccGACTTTGGCTTGGATTGTGATGAACACAGTAC
TGAGTCTCGCTGTTGT**CGT**TATCCACTGACAGTTGACT
TTGAAGCGTTTGGCTGGGATTGGATCATTGCTCCGAAA
CGCTACAAAGCGAACTACTGCAGTGGTGAGTGTGAGTT
TCTGTTTCTGCAGAAGTATCCTCACACACATCTTGTCC
ATCAAGCGAATCCGAAAGGCTCAGCTGGTCCGTGCTGC
ACACCGACCAAGATGAGTCCGATCAACATGCTGTA CTT
CAACGGCAAAGAACAGATCATCTATGGCAAGATTCCAG
GCATGGTTGTGGATCGTTGTGGCTGCAGC**taactcgag**

pET-28a(+)

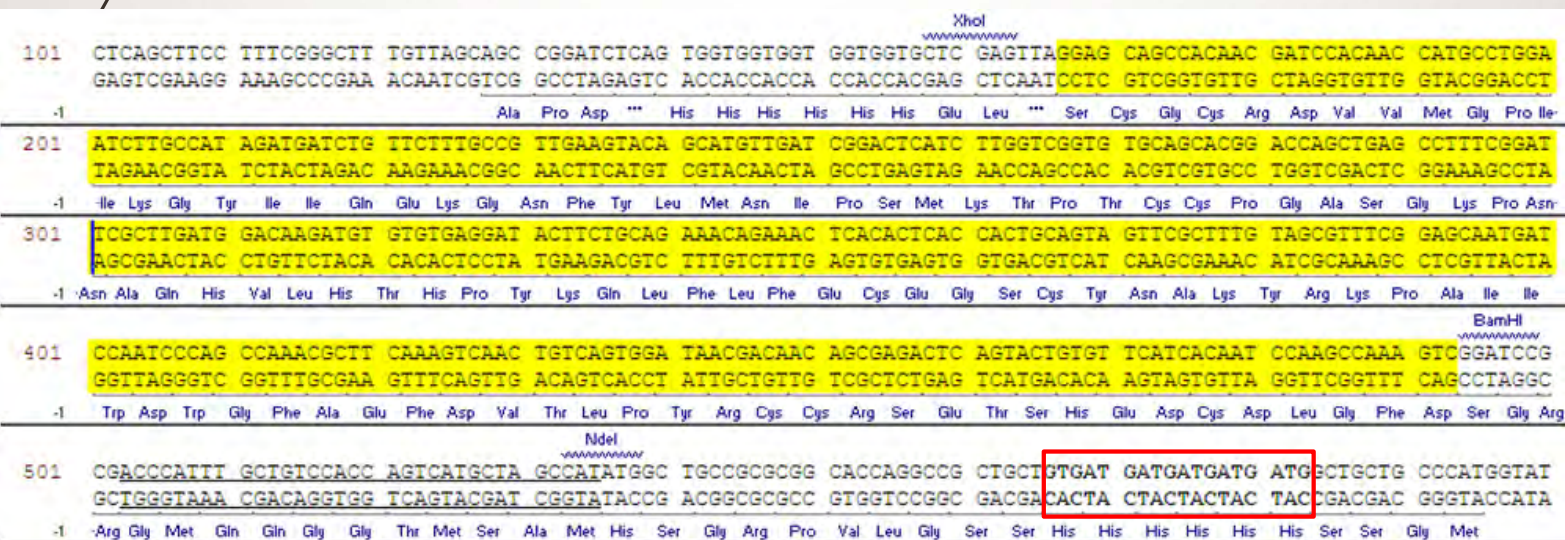
Бактериальный вектор для экспрессии N-терминированных 6xHis-
 тэгированных белков с тромбиновым сайтом



В кодирующую последовательность гена рМСТН ввели сайты для клонирования в рЕТ28(+): **ggatcc** –XhoI, **ctcgag** – BamHI

Желтым выделена
последовательность MSTN, в
красной рамке 6xHis,
подчеркнуто – T7 tag

Плазмида, трансформированная в штамм-продуцент *E.coli*, даст нужный белок для очистки на Ni-сефарозе.



Аминокислотная последовательность рМСТН

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSDFGLCDENHSTESRCCRY
PLTVDFEAFGWDWIAPKRYKANYCSGECFLFLQKYPHTHLVHQAHPKGS
GPCSTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPGMVVDRCGCS*

Аффинные тэги (пептидные последовательности, усиливающих растворимость экспрессируемого белка):

- **6xHis** (лиганд – Ni²⁺--сефароза, Ni²⁺-NTA агароза, элюирование 20–250 мМ имидазол, низкий pH), емкость аффинных сорбентов для металлохелатной хроматографии (например, Ni-NTA агароза, Ni-IDA-сефароза) составляет до 40 мг рекомбинантного белка на 1 мл сорбента.
- **Тег Т7** - первые 11 ак белка 10 гена фага Т7: эпитоп, который может быть обнаружен иммунологически, очистка на иммуноаффинной колонке.
- **Тромбиновый сайт** - узнавание протеиназой и гидролиз
- **Миостатин** – зрелый белок

В он-лайн программе **PROTPARAM** были рассчитаны основные физико-химические показатели потенциального рекомбинантного миостатина, определен аминокислотный состав

<https://www.protparam.net/index.html>

PROTEIN ANALYSIS

Sequence

The submitted protein sequence has 143 amino acids:

MGSSHHHHHH SGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSDFGSLDC DEHSTESRCC 50
RYPLTVDFEA FGWDWIIAPK RYKANYCSGE CEFLFLQKYP HTHLVHQANP 100
KGSAGPCCTP TKMSPINMLY FNGKEQIIYG KIPGMVVDRC GCS 143

Средний молекулярный вес: 15923.0794 Да

Заряд и гидрофобность

Negatively charged residues (D, E) = 12 (8.39%)

Positively charged residues (K, R, H) = 24 (16.78%)

Polar residues (C, S, Q, N, T, Y) = 43 (30.07%)

Hydrophobic residues (A, G, I, L, M, P, F, W, V) = 64 (44.76%)

Алифатический индекс: 49.79

Общее среднее значение гидропатичности (GRAVY): -0.490

Коэффициент экстинкции: 19940

A 1mg/ml (62.802 uM) solution of your protein has an A280nm of: 1.25

Изоэлектрическая точка pKa , определенная разными методами: 7.75 и 7.42.

Amino Acid	Count	% Total
Alanine (A)	6	4.20
Arginine (R)	6	4.20
Asparagine (N)	4	2.80
Aspartic acid (D)	6	4.20
Cysteine (C)	9	6.29
Glutamine (Q)	5	3.50
Glutamic acid (E)	6	4.20
Glycine (G)	16	11.19
Histidine (H)	11	7.69
Isoleucine (I)	6	4.20
Leucine (L)	7	4.90
Lysine (K)	7	4.90
Methionine (M)	7	4.90
Phenylalanine (F)	6	4.20
Proline (P)	9	6.29
Serine (S)	13	9.09
Threonine (T)	6	4.20
Tryptophan (W)	2	1.40
Tyrosine (Y)	6	4.20
Valine (V)	5	3.50

4. Выбор бактериального штамма для трансформации и экспрессии рекомбинантного белка

Escherichia coli **BL21 (DE3)** и экспрессирующий вектор **pET** - наиболее репрезентативная система производства рекомбинантного белка.

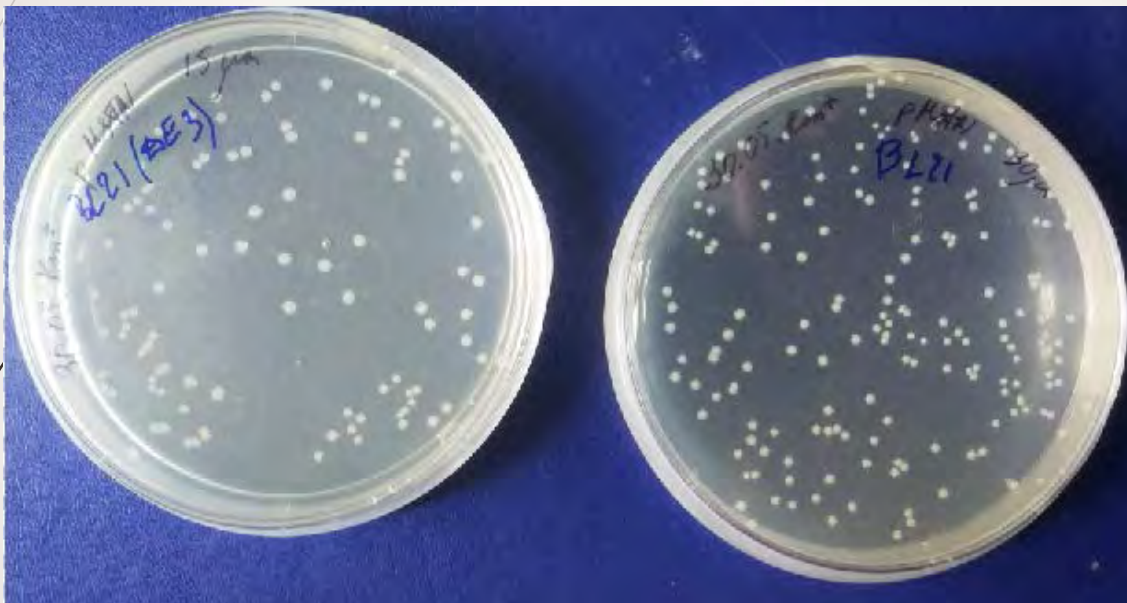
В *E. coli* BL21 (DE3) экспрессия гена, кодирующего целевой белок (ген находится на плазмиде pET), управляется кодируемой хромосомой РНК-полимеразой бактериофага T7 (**T7 RNAP**). T7 RNAP специфически распознает промотор T7 плазмиды и транскрибируется в восемь раз быстрее, чем RNA-полимераза *E. coli*.

Ген, кодирующий T7 RNAP, регулируется изопропил β -D-1-тиогалактопиранозид (**IPTG**) - индуцибельным промотором lacUV5 (P_{lacUV5}). Клетки не способны гидролизовать IPTG, для эффективной индукции требуется низкая концентрация 0,1–2,0 мМ

Таким образом создается система сверхэкспрессии рекомбинантного белка: чем больше синтезируется мРНК, тем больше белка может быть произведено. Однако эта система не подходит для токсичных рекомбинантных белков.

5. Получение бактериального штамма-продуцента рекомбинантного миостатина

5.1. Получение компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3) и химическая трансформация плазмидой *pET-28a(+)-MSTN*



Клоны, выросшие на селективной среде с канамицином, после трансформации *E.coli* BL21 (DE3) плазмидой.

Один из клонов, выросший на селективной канамицин-содержащей среде ЛБ-агароза, использовали для подбора условий выращивания, индукции и наработки рекомбинантного миостатина.

5.2. Подбор условий культивирования. Проверка эффективности индукции синтеза рекомбинантного миостатина

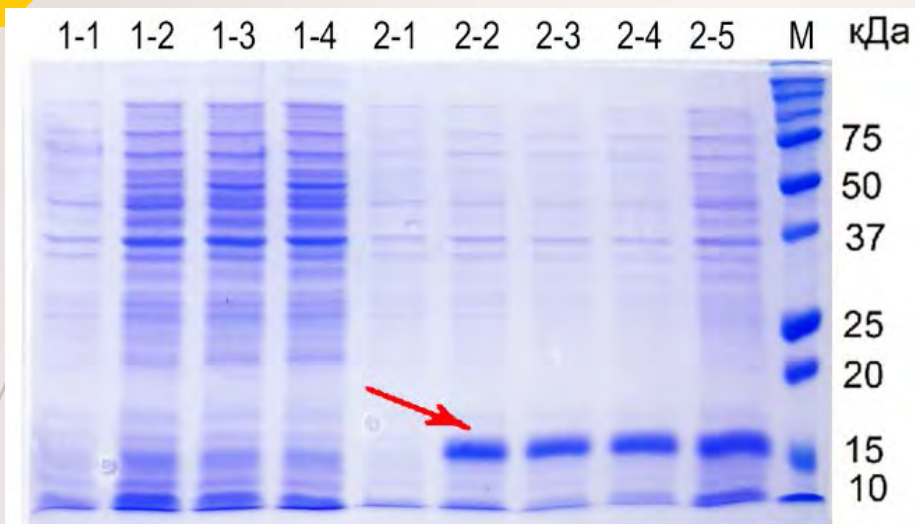


Фото 1. ПААГ электрофорез (12,5%) образцов клеточной суспензии:

Пробы 1-1 – 1-4 – без индукции ИПТГ,

Пробы 2-1-2-5 - IPTG-индукция.

Образцы 1-1 и 2-1 взяты в момент введения ИПТГ (1,5 часа), при одинаковой плотности культуры.

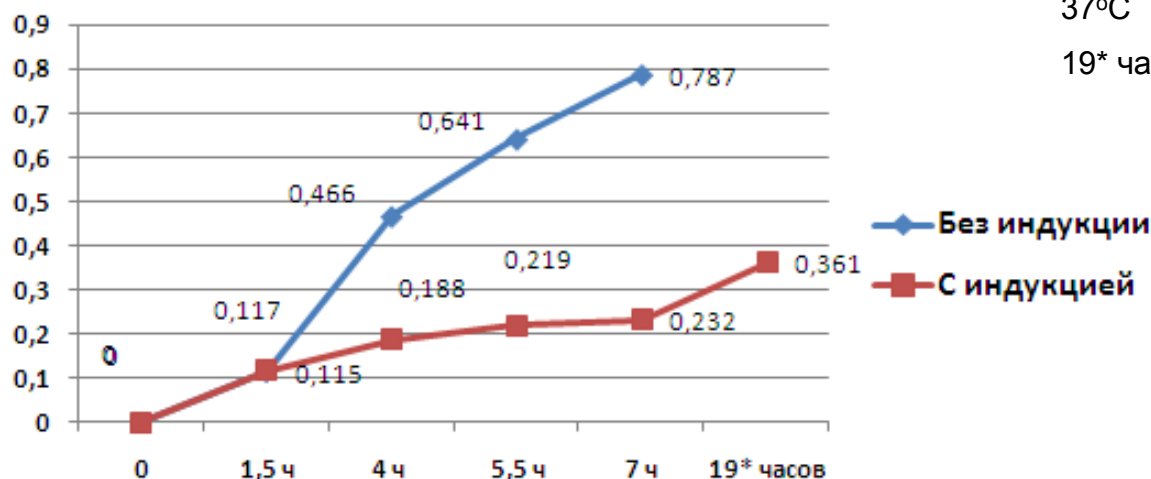
Образцы перед нанесением нормализованы по содержанию белка.

Условия культивирования:

ЛБ-среда, канамицин 60 мкг/мл, наращивание в термошейкере при 37°C

19* часов – из них 12 часов при 22°C

Динамика роста продуцирующей культуры в зависимости от внесения ИПТГ



5.2. Подбор условий культивирования. Проверка влияния времени введения ИПТГ на эффективность экспрессии рМСТН

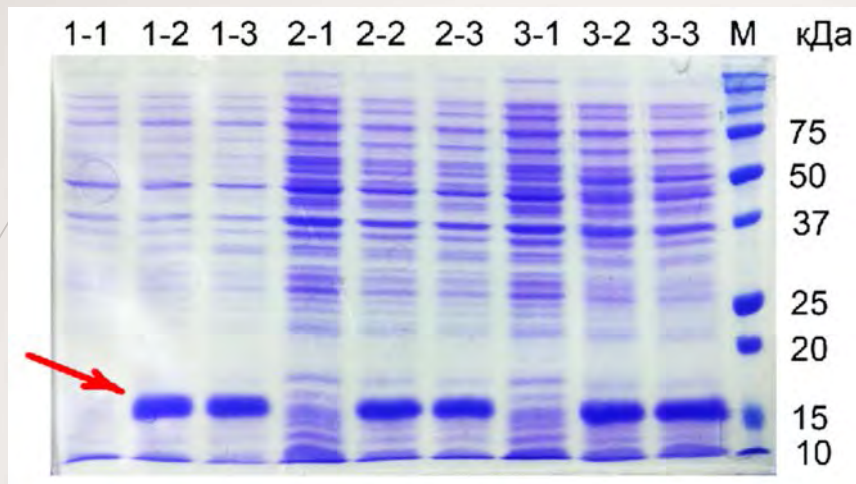


Фото 1. ПААГ электрофорез (12,5%) образцов клеточной суспензии:

Пробы 1-1 – 1-3 – Ранняя индукция ИПТГ: 0,146 о.е..

Пробы 2-1-2-3 – средняя индукция: 0,465 о.е.

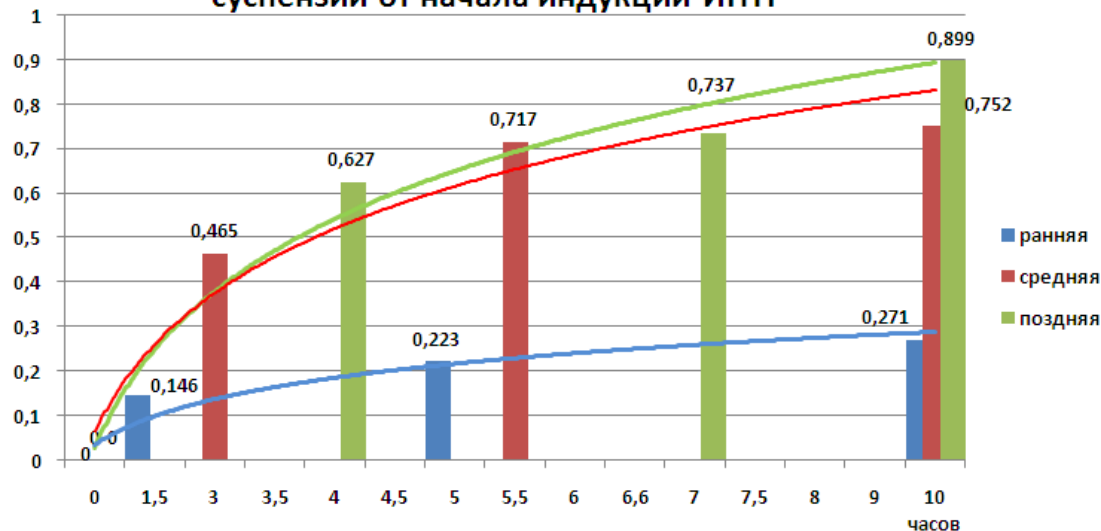
Пробы 3-1-3-3 – поздняя индукция: 0,627 о.е.

Образцы перед нанесением нормализованы по содержанию белка.

Условия культивирования:

ЛБ-среда, канамицин 60 мкг/мл, наращивание в термошейкере при 37°C

Зависимость оптической плотности клеточной суспензии от начала индукции ИПТГ





Методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле было показано, что IPTG-индукция (до 1 мМ) штамма-продуцента в селективной среде (канамицин, 60 мкг/мл) на стадии роста, соответствующей 0,15 о.е. ($\lambda=595$ нм) с последующим наращиванием в термошейкере при 37°C до 0,22-0,27 о.е. приводила к высокой экспрессии рекомбинантного миостатина, доля которого составляла не менее 60-70% общего белка.

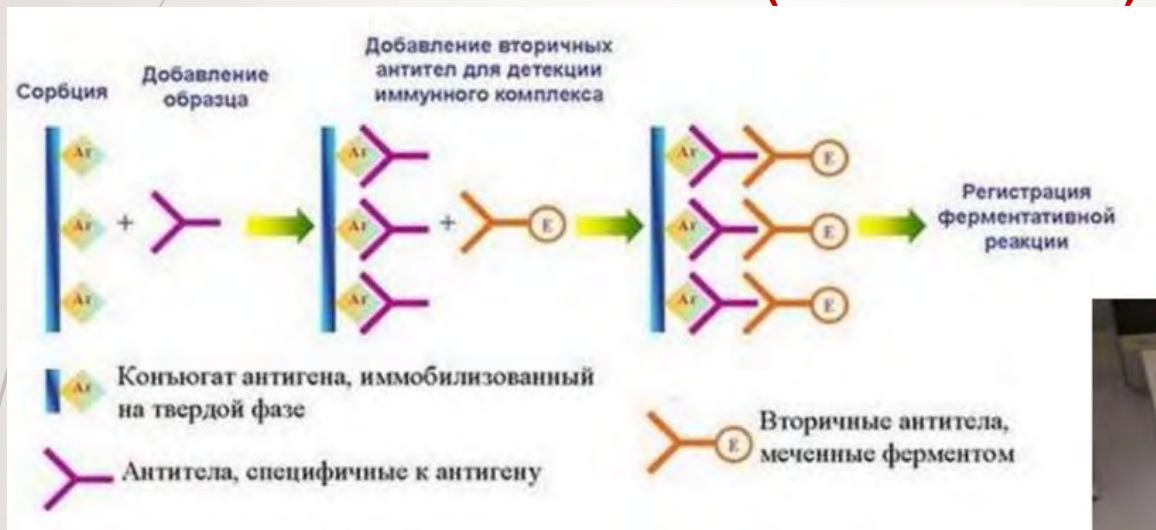
При индукции на более поздних стадиях (0,47-0,63 о.е.) напротив, содержание рекомбинантного белка уменьшалось до 50-55%.

Размер рекомбинантного белка, определенный ПААГ-электрофорезом, был около 16 кДа, что соответствует вычисленной массе 15,9 кДа.

Полученным **рМСТН** будут иммунизированы овцы, у которых будет оценена иммуногенность полученного белка.

Разрабатывается **тест-система** для определения титра антител к миостатину в крови.

Схема ИФА (тест-система)



Иммуноферментный анализ.



Пояснения:

Аг, антиген – рекомбинантный миостатин;

Первые антитела, специфичные к рекомбинантному миостатину – образец, сыворотка иммунизированных рекомбинантным миостатином овец;

Вторичные антитела - аффинно очищенные антитела кролик-анти-IgG овцы, конъюгированные с пероксидазой хрена. Субстрат для пероксидазы хрена, например, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; субстратный буфер (содержит перекись водорода).

**Спасибо
за
внимание!**

